N° d'ordre
C 28-4

N° d'enregistrement au C.N.R.S.
A.O. 11475

Brest 1975

THESE

présentée

à l'Université de Bretagne Occidentale

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Bernard DARTIGUES

Action rénale et Métabolisme de dérivés de la dithiole-1,2 thione-3

Soutenue le 22 Novembre 1975 devant la commission d'examen :

Messieurs les Professeurs :

F. MOREL, Collège de France — Président

C. PEYRAUD, Université de Bretagne Occidentale

R. GUGLIELMETTI, Université de Bretagne Occidentale

P. BLANQUET, Université de Bordeaux II

J. CANELLAS, Université de Bordeaux II

— Examinateurs

-1975-

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545814_0025

N° d'ordre
C 28-4

N° d'enregistrement au C.N.R.S.
A.O. 11475

THESE

présentée

à l'Université de Bretagne Occidentale

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Bernard DARTIGUES

Action rénale et Métabolisme de dérivés de la dithiole-1,2 thione-3

Soutenue le 22 Novembre 1975 devant la commission d'examen :

Messieurs les Professeurs :

F. MOREL, Collège de France	Président
C. PEYRAUD, Université de Bretagne Occidentale	Examinateurs
R. GUGLIELMETTI, Université de Bretagne Occidentale	
P. BLANQUET, Université de Bordeaux II	
J. CANELLAS, Université de Bordeaux II	

-1975-

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Président : Professeur QUERRE Julien

Directeurs de Thèse en Sciences pour l'année 1974 - 1975 :

U.E.R. SCIENCES Présidents : Professeur LE FLOCH Jean
Professeur SAUMAGNE Pierre

Professeurs :	M. BOCLE Jean	(Mathématiques)
	M. JOHANNIN Pierre	(Physique)
	M. BELLON Louis	(Chimie)
	M. QUERRE Julien	(Mathématiques)
	Mme MOREAU Mireille	(Biologie)
	M. DIDIER Jean	(Géologie)
	M. PERESSE Joseph	(Physique)
	M. SAUMAGNE Pierre	(Chimie)
	Mme COURTOT Jacqueline	(Chimie)
	M. COURTOT Pierre	(Chimie et Océanographie)
	M. LE FLOCH Jean	(Océanographie)
	M. GUERCHAIS Jacques	(Chimie)
Professeurs sans chaire :	Mme JOHANNIN Andrée	(Physique)
	Mme LAHAYE Jacqueline	(Biologie)
	M. SERPOLAY Roger	(Physique)
	M. BABIN Claude	(Géologie)
	M. CHEZE Claude	(Physique)
	M. GENIN Robert	(Physique)
	M. PEYRAUD Claude	(Physiologie)
	M. STURTZ Claude	(Chimie)
	M. BERTHE Guy	(Mathématiques)
	Mme GENIN Janine	(Physique)
	M. PENOT Michel	(Biologie)
	M. WOLFF Claude	(Physique)
	M. PICARD Elie	(Physique)
Maîtres de Conférence :	M. QUIVY Denis	(Physique)
	M. LUCAS Albert	(Biologie)
	M. RENOUX André	(Physique)
	M. BROISE Michel	(Mathématiques)
	M. PELHATE Joseph	(Biologie)
	M. LAURANSAN Jacques	(Chimie)
	M. GRAVELLE Michel	(Géologie)
	M. BOUVIER Pierre	(Physique)
	M. COUDEVILLE Henri	(Physique)
	M. SAVARY Gérard	(Physique)
	M. GUGLIELMETTI Robert	(Chimie)
	M. BOLLEY Pierre	(Mathématiques)
	M. CARVALLO Michel	(Mathématiques)
	M. CLERET Jean-Jacques	(Biologie)
	M. GLEMAREC Michel	(Océanographie)
	M. TOURNEMINE Georges	(Mathématiques)
	M. BOURGEOIS Claude	(Biologie)
Maîtres de Recherche au C.N.R.S. :	M. MOREAU Claude	(Biologie)
	M. CHAURIS Louis	(Géologie)

AVANT-PROPOS

Lorsque Monsieur le Professeur PEYRAUD nous a proposé ce sujet de recherche, nous y avons souscrit avec une certaine appréhension du fait de notre manque d'expérience dans un domaine aussi particulier que la pharmacologie des diurétiques.

Les premiers résultats devaient nous inciter à poursuivre cette étude mais il devenait bientôt nécessaire d'augmenter nos moyens et d'étendre le champ de nos investigations.

Nos obligations professionnelles devaient alors nous conduire à BORDEAUX où nous avons heureusement bénéficié de l'accueil généreux de messieurs les Professeurs CANELLAS, ROQUEBERT et BLANQUET de l'Université de BORDEAUX II. Nous avons pu sous leur direction nous familiariser avec les techniques d'études pharmacologiques et poursuivre nos recherches dans un cadre élargi, tout en maintenant une étroite collaboration avec le Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de BREST où ce travail s'est ensuite achevé.

Dans cette recherche deux voies s'offraient à nous. Nous pouvions envisager soit de révéler le plus grand nombre possible de données d'ensemble, soit de nous livrer à l'étude exhaustive d'un point particulier. Le fait qu'il s'agissait d'un diurétique d'un type nouveau nous a fait choisir la première de ces possibilités.

L'acquisition de ces données ouvre maintenant la voie à des recherches plus approfondies notamment dans le domaine de la physiologie cellulaire. Un travail de cette nature nécessiterait l'emploi de techniques spécialisées que nous n'avons pas eu jusqu'à ce jour la possibilité de mettre en œuvre.

A tous ceux qui par leur aide et leurs conseils ont permis la réalisation de ce travail, nous exprimons notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur C. PEYRAUD nous a proposé ce sujet de recherche. Il en a dirigé la progression avec patience et rigueur et nous a guidé parmi les difficultés, révélant ses hautes qualités humaines et scientifiques. En lui nous avons trouvé le Maître et l'Ami à qui nous exprimons notre affectueuse reconnaissance et notre profond attachement.

Monsieur le Professeur F. MOREL a bien voulu, malgré ses lourdes charges, s'intéresser à nos recherches et nous recevoir à plusieurs reprises pour analyser nos résultats expérimentaux et nous faire bénéficier de suggestions très positives pour la conduite de ce travail. Il nous a fait le très grand honneur d'assurer la Présidence de notre jury. Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance et de notre très vive admiration.

Monsieur le Professeur P. BLANQUET nous a accueilli dans son service de l'I.N.S.E.R.M., nous faisant bénéficier de ses enseignements et mettant à notre disposition les moyens de son laboratoire pour nous permettre de réaliser une part très importante de cette recherche. Nous l'en remercions très respectueusement et l'assurons de notre profond attachement.

Monsieur le Doyen J. CANELLAS nous a généreusement offert la possibilité de poursuivre ce travail à BORDEAUX en lui donnant une impulsion nouvelle. Il a bien voulu nous admettre dans son équipe, nous initier aux techniques de la Pharmacodynamie et nous apporter le soutien précieux de ses conseils et de ses encouragements. Qu'il trouve ici le témoignage de notre très vive reconnaissance et de notre respectueuse amitié.

Monsieur le Professeur R. GUGLIELMETTI, spécialiste des hétérocycles, nous a apporté son précieux concours pour analyser les problèmes de structure moléculaire, nous permettant ainsi d'aborder plus fructueusement la question des relations entre les caractères physico-chimiques et l'activité physiologique des composés étudiés. Nous lui exprimons toute notre gratitude et notre respectueux attachement.

Monsieur le Professeur J. ROQUEBERT nous a permis par sa collaboration directe, l'appui de ses conseils et le soutien de son amitié de franchir une étape capitale de ce travail de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre sincère amitié.

Monsieur le Docteur J. LAPARRA nous a initié aux techniques radiobiologiques et nous a prodigué avec sollicitude ses conseils, son aide et ses encouragements, nous faisant largement bénéficier de sa très grande expérience de la recherche. Nous lui manifestons notre reconnaissance et l'assurons de notre respectueuse amitié.

Monsieur A. DORANGE, malgre ses lourdes tâches, a réalisé pour nos besoins la synthèse de nombreux composés, pour la plupart originaux, indispensables à cette étude. Nous lui exprimons nos très chaleureux remerciements.

Monsieur le Docteur C. TREBAUL nous a fourni des produits originaux très importants pour la réalisation de nos recherches. Nous l'en remercions très vivement.

Monsieur le Docteur A. BELAUD nous a fait bénéficier de son aide et de ses conseils au début de ce travail. Nous lui exprimons nos remerciements.

Nous remercions très sincèrement tous ceux qui nous ont apporté la précieuse assistance de leurs conseils, de leur aide ou de leurs moyens techniques

Monsieur le Professeur R. BABIN
Monsieur le Professeur R. CROCKETT
Monsieur le Professeur Agrégé G. BALOUET
Madame le Docteur BRACHET-LIERMAIN
Monsieur le Docteur SAUREL
Monsieur N'GUYEN BA CANG
Mademoiselle le Docteur MOURIEZ
Madame MABILON
Madame PERALES
Monsieur AURENCHE
Monsieur LE GAOUYER
Monsieur DROGUET

Nous honorons la mémoire de Monsieur le Professeur DELMON qui nous a initié aux techniques histochimiques.

Nous remercions les Laboratoires LATEMA et HOESCHT qui nous ont généreusement fourni des produits utiles à nos recherches.

Nous remercions et nous voulons honorer nos chefs et nos camarades du Service de Santé des Armées qui nous ont offert toutes les facilités pour pouvoir réaliser ce travail parallèlement aux tâches de notre service.

ACTION RENALE ET METABOLISME

DE DERIVES DE LA DITHIOLE - 1,2 THIONE - 3

PLAN D'ENSEMBLE

Avant-Propos

Introduction

Chapitre I - Modalités générales d'action des diurétiques - Généralités sur les dithiole-thiones.

Chapitre II - Mise en évidence des propriétés diurétiques - Recherche d'une relation structure-activité.

Chapitre III - Effets du T.S.S. chez l'animal.

Chapitre IV - Recherche du lieu d'action du T.S.S.

Chapitre V - Répartition, métabolisme, élimination du T.S.S.

Chapitre VI - Action et localisation du T.S.S. au niveau cellulaire, hépatique et rénal.

Conclusion Générale

Bibliographie

INTRODUCTION

Les essais d'un nouveau dérivé hydrosoluble de la dithiole-1,2 thione-3 devaient révéler, contre toute hypothèse, que ce produit n'exerçait aucune action cholérétique, mais qu'il possédait par ailleurs d'intéressantes propriétés diurétiques.

Compte tenu de l'originalité de ce composé par rapport aux autres diurétiques connus, il était intéressant de définir les modalités de son action et d'en rechercher les causes.

Il importait dans un premier temps de caractériser dans la molécule les facteurs physico-chimiques responsables de l'action diurétique. Cette étude impliquait la préparation de dérivés voisins originaux; elle a pu se poursuivre grâce au travail des chercheurs des Laboratoires de synthèse organique.

La recherche d'une relation structure-activité à partir de l'étude des effets comparés de ces substances devait révéler le site actif de la molécule ainsi que les conditions nécessaires à son action. Elle permettait de faire choix pour la suite de notre travail du composé le plus actif et le plus représentatif de cette nouvelle série de diurétiques.

A partir de ce matériau nous pouvions dès lors aborder l'étude des mécanismes d'action au niveau du néphron.

Cette investigation débutait par la détermination des effets du produit chez le rat et chez le chien, et se poursuivait par la recherche du site d'action tubulaire.

Ces données devaient être complétées par une étude du devenir métabolique de ces substances.

La connaissance de ces différents points nous permettait ensuite d'entreprendre une étude des modalités d'action au niveau cellulaire, avant d'apporter une conclusion à cette série de recherches.

C H A P I T R E I

MODALITES GENERALES D'ACTION DES DIURETIQUES

GENERALITES SUR LES DITHIOLE-THIONES

Avant d'exposer les résultats de notre travail personnel, nous avons jugé nécessaire de rappeler quelques données actuelles sur la physiologie rénale et la pharmacologie des diurétiques et de résumer certains aspects de la chimie des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3.

Nous avons limité volontairement cet aperçu aux connaissances qui sont en rapport direct avec nos investigations et qui doivent intervenir dans la discussion des résultats.

I. MODALITES D'ACTION DES DIURETIQUES.

Au cours des dernières années, il est apparu un nombre considérable d'informations sur la physiologie du néphron et parallèlement sur la pharmacologie des diurétiques. Nous ne pouvons les envisager dans le détail; elles ont été passées en revue dans de nombreux articles et ouvrages (PITTS 1958, FRANCOIS 1963, BANK 1968, FUMAGALLI 1968, GIROUD et SCHMITT 1968, HESS 1968, WEPIERRE 1969, PITTS 1970, LANDON et FORTE 1971, ORLOFF et BURG 1971, de STEVENS 1971, ZINS 1971, MOREL et de ROUFFIGNAC 1973, ZINS 1973).

A la lumière de ces travaux, nous allons tenter de faire le point sur les connaissances actuelles relatives à nos investigations.

1. PHYSIOLOGIE DU NEPHRON. (Fig. I. 1.)

Nous allons envisager les différents mécanismes de l'élaboration de l'urine et plus particulièrement ceux qui régissent l'excrétion hydro-électrolytique à seule fin de situer le niveau d'action des divers diurétiques.

A. Fonction du glomérule.

La membrane de la capsule de BOWMAN se comporte comme un ultrafiltre perméable à tous les constituants du plasma sanguin à l'exception des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 70.000. Le filtrat qui la traverse sous l'effet de la pression de filtration est isotonique avec le plasma mais plus riche en chlorure par suite de l'équilibre de DONNAN.

B. Fonction du tubule proximal.

Le filtrat glomérulaire subit au cours de son passage dans le tubule proximal différentes modifications dans son volume et sa composition. On admet, suivant les auteurs, que 60 à 90 % du liquide filtré sont réabsorbés à ce niveau.

Les microtechniques ont révélé que la réabsorption de l'eau était apparemment secondaire à celle du sodium.

Le sodium, qui pénètre passivement dans la cellule tubulaire, est expulsé dans l'espace interstitiel contre un gradient électrochimique. Ce mécanisme de transport actif utilise vraisemblablement la "pompe à sodium" de la membrane basale de la cellule tubulaire. La réabsorption du sodium est contrôlée par les minéralo-corticoïdes et principalement par l'aldostérone qui semblerait agir également sur l'activité ATPasique Na-K au niveau de la membrane basale (MOREL et de ROUFFIGNAC 1973).

La réabsorption du sodium provoque l'apparition d'un gradient électrochimique qui entraîne passivement les ions chlore dans l'espace interstitiel.

Le potassium est réabsorbé en très grande partie. Il doit pour cela traverser la membrane apicale de la cellule tubulaire contre une différence de potentiel électrochimique; il faut donc admettre l'existence à ce niveau d'une "pompe à potassium". Cet ion diffuse ensuite de la cellule dans le milieu interstitiel.

La réabsorption du bicarbonate se fait suivant un mécanisme particulier couplé avec le mécanisme d'acidification et qui nécessite l'intervention de l'anhydrase carbonique. En échange d'ions sodium diffusant dans les cellules tubulaires, des ions H^+ sont exportés dans la lumière tubulaire; ils forment avec l'ion bicarbonate de l'acide carbonique qui se dissocie en anhydride et eau. Le gaz carbonique diffuse dans la cellule tubulaire où, sous l'action de l'anhydrase, il reforme de l'acide carbonique qui se dissocie en $HCO3^-$ et H^+. L'ion bicarbonate diffuse alors dans le milieu interstitiel en accompagnant l'ion Na^+. Le résultat est la réabsorption d'une molécule de bicarbonate de sodium. Ce mécanisme a été récemment étudié par MALNIC et de MELLO-AIRES (1971) et par ULLRICH et coll. (1971).

Il est admis qu'environ 90 % du bicarbonate filtré est réabsorbé par cette voie.

Le départ des électrolytes crée un gradient osmotique qui assure la réabsorption passive de l'eau par suite de la perméabilité de la cellule tubulaire proximale. PERSSON et ULFENDAL (1970) ont montré que le passage de l'eau à travers le membrane était un phénomène osmotique pouvant s'effectuer grâce à des pores.

La réabsorption de l'eau est dite obligatoire et isoosmotique car elle accompagne toujours celle des substances dissoutes de sorte que le contenu tubulaire soit en équilibre osmotique avec le milieu interstitiel qui est lui-même à ce niveau isotonique par rapport au plasma.

Selon GIEBISCH (1969) le passage des ions dans le milieu interstitiel pourrait également s'effectuer par une voie extracellulaire.

L'aspect quantitatif de ces transferts hydro-électrolytiques semble sous la dépendance d'un mécanisme encore mal connu appelé improprement par les Anglo-Saxons "Glomerulo-Tubular-Balance", que l'on peut traduire par Equilibre glomérulo-tubulaire. Ce terme a été introduit par SMITH (1951) pour définir la propriété que possède le rein de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique. Des définitions plus restrictives ont été proposées par WINDHAGER (1968 a) et ORLOFF et BURG (1971).

On appele actuellement Equilibre glomérulo-tubulaire le phénomène qui assure la réabsorption dans le tubule proximal d'une fraction constante du sel et de l'eau filtrés par le glomérule et qui contribue à stabiliser la pression tubulaire proximale et l'apport de liquide aux parties plus distales du néphron.

Le glucose, les phosphates, les sulfates, les acides aminés, certains acides organiques, l'acide urique sont partiellement réabsorbés par des processus actifs, ce qui par le fait limite la capacité de réabsorption de ces substances.

L'urée tend à se répartir de part et d'autre de la membrane cellulaire suivant un équilibre passif de diffusion.

Le tubule proximal est également le siège d'une sécrétion active de certaines substances (WEINER et MUDGE 1964). On définit un système d'excrétion des acides organiques responsable en particulier de l'excrétion de l'acide para-amino-hippurique, du probénécide, des conjugués phénoliques, des sulfamides, de la pénicilline et de la plupart des diurétiques. On définit également un système d'excrétion des bases azotées.

C. Fonction de l'anse de HENLE.

Le liquide qui parvient à l'anse de HENLE est iso-osmotique par rapport au plasma; ce n'est qu'à partir de ce niveau du néphron qu'interviennent les mécanismes de concentration-dilution susceptibles

d'en modifier l'osmolarité.

La découverte d'un gradient osmotique cortico-papillaire a permis de considérer l'anse de HENLE comme un échangeur fonctionnant suivant le principe d'un système multiplicateur de concentration à contre-courant (WIRZ, HARGITAY et KUHN, 1951).

Cette hypothèse ne peut se concevoir que si l'on admet qu'il peut s'établir une différence d'osmolarité entre le liquide ascendant et le liquide descendant à chaque niveau de l'anse.

Plusieurs conditions sont indispensables. Le sodium doit être réabsorbé activement à partir de la branche ascendante qui doit être imperméable à l'eau; la branche descendante, par contre, doit se trouver perméable à l'eau, ou bien au sodium, ou encore aux deux à la fois.

L'existence de ces conditions et par conséquent la réalité de ce mécanisme ont été démontrées par des études au moyen de micro-ponctions sur des anses de rat (JAMISON 1968) et de Psammomys (de ROUFFIGNAC et MOREL 1969).

A partir de ces données, on peut schématiser comme il suit le fonctionnement de l'anse de HENLE :

- Dans la branche descendante, l'eau diffuse passivement vers le milieu interstitiel sous l'effet d'un gradient osmotique tandis que le chlorure de sodium, plus concentré au même niveau dans le parenchyme, diffuse vers l'intérieur du tubule. L'intensité de ces transferts a été étudiée. KOKKO (1970, 1972) a montré que ce segment était plus perméable à l'eau qu'au chlorure de sodium. De ROUFFIGNAC et MOREL (1969) ont établi que, chez le Psammomys, l'augmentation de la pression osmotique dans la branche descendante résultait principalement de l'addition de soluté, 15 % seulement de cet accroissement étant la conséquence de la réabsorption de l'eau.

Pour justifier ces divergences, MOREL et de ROUFFIGNAC (1973) ont émis l'hypothèse que la perméabilité aux solutés de la branche descendante pourrait être favorisée par l'A.D.H..

Dans la branche ascendante imperméable à l'eau s'effectue, sous la dépendance de l'aldostérone, une réabsorption de chlorure de sodium entraînant une importante diminution de l'osmolarité du liquide tubulaire.

De nombreux auteurs ont établi que le sodium était réabsorbé activement.

Des travaux récents (BURG et GREEN 1973 b, ROCHA et KOKKO 1973) permettent de considérer que la réabsorption du chlore est également un phénomène actif et sélectif, l'ion bicarbonate n'étant pas réabsorbé à ce niveau (ROSIN et coll. 1970, WALLIN et coll. 1973 2 ref.

L'établissement du gradient de concentration cortico-papillaire est la conséquence de la mise en jeu de ces mécanismes et de la multiplication de proche en proche des effets élémentaires. Les preuves de la réalité de ce processus ont été apportées par MOREL et GUINNEBAULT (1961) et par GUINNEBAULT (1964), qui ont montré, en utilisant le radiosodium et l'eau tritiée chez le lapin, que l'eau pouvait "court-circuiter" le trajet du sodium.

Des formations circulatoires adaptées, les vasa recta, assurent l'élimination des excès d'eau et de soluté, grâce à leur configuration "en épingle à cheveu", et contribuent à maintenir constantes les caractéristiques du gradient.

Notons que l'urée joue dans l'établissement et le maintie de ce gradient un rôle important mais peu connu (MOREL et de ROUFFIGNAC 1973).

Il convient également de noter que seuls le sodium et le chlore réabsorbés dans la partie médullaire contribuent à la constitution du gradient.

L'urine est ainsi nettement hypotonique lorsqu'elle atteint l'extrêmité de la branche ascendante de l'anse de HENLE et pénètre dans le tubule distal.

Ces caractères ont conduit SELDIN et coll. (1966) à considérer la branche ascendante comme un "segment de dilution" dans lequel ils distinguent une partie médullaire et une partie corticale (qui comprend aussi la portion initiale du tubule contourné distal).

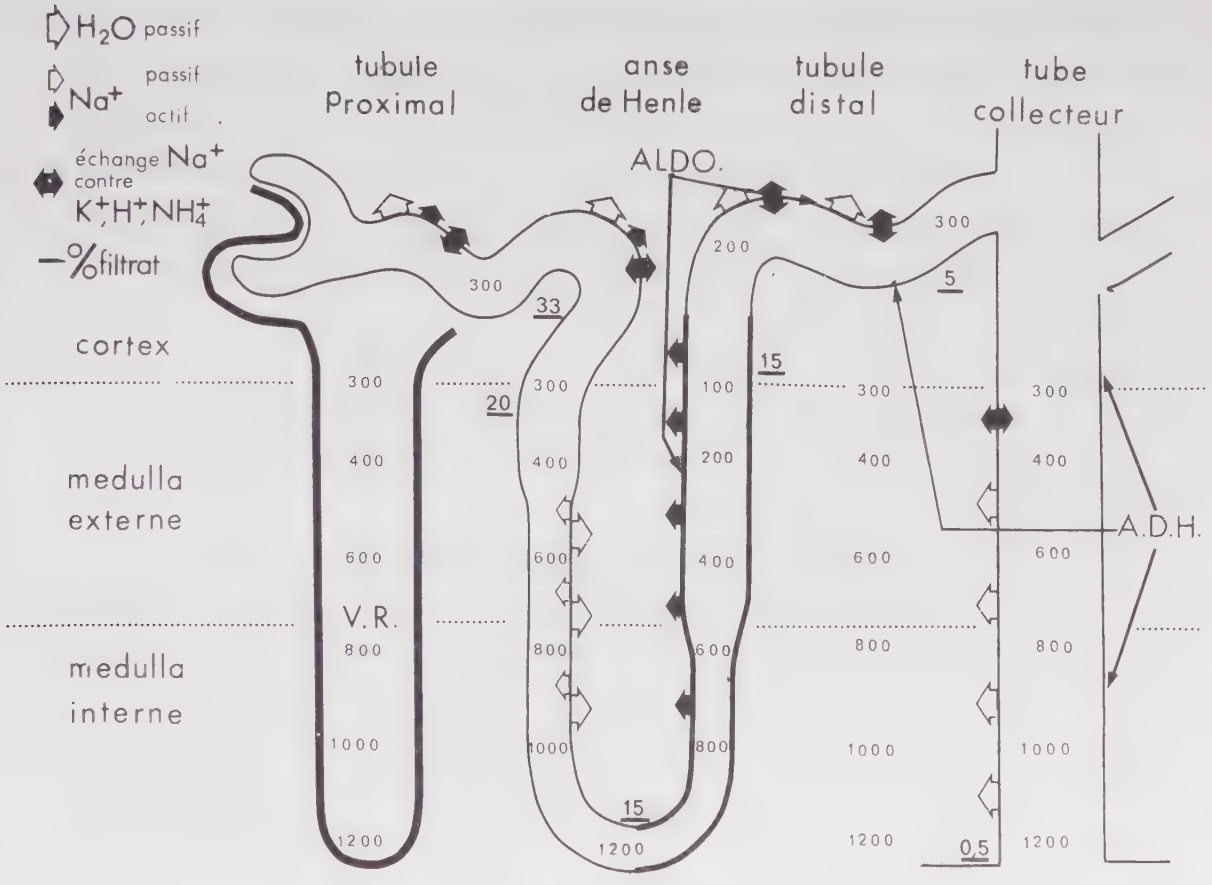


Fig I. 1.- *Transferts hydro-électrolytiques et gradient osmotique cortico-papillaire dans le néphron.*
(Les chiffres en gros caractères indiquent les pourcentages du filtrat glomérulaire restant à chaque niveau du tubule)

D. Fonction du tubule distal.

Sous l'action des mécanismes qui assurent un transfert d'eau et d'électrolytes, le liquide tubulaire devient rapidement isotonique par rapport au plasma, mais jamais hypertonique.

Les échanges distaux ont été étudiés à partir de microponctions par LE GRIMELLEC et de ROUFFIGNAC (1969).

Le sodium peut être réabsorbé en petites quantités contre un gradient électrochimique élevé, donc par transport actif, au niveau de la membrane basale de la cellule tubulaire. Sa réabsorption est sous la dépendance des minéralo-corticoïdes et de l'aldostérone dont l'action se situe principalement à ce niveau.

Le potassium est sécrété sur toute la longueur du tubule distal. Puisque cet ion est pratiquement réabsorbé en totalité au niveau proximal, il faut considérer que la quasi-totalité du potassium excrété est d'origine distale.

Le mécanisme de transport du K^+ est commun avec celui des ions H^+; il y a en effet compétition dans l'excrétion de ces deux ions.

La compréhension du mécanisme d'excrétion du potassium au niveau distal est loin d'être complète. Ainsi, KAHN et coll. (1971) ont montré que l'augmentation de l'excrétion potassique sous l'effet de l'acide éthacrynique, chez le chien, ne pouvait uniquement s'expliquer par un accroissement des échanges du Na contre du K consécutivement à l'augmentation de l'apport du sodium dans le tubule distal. La réabsorption du sodium est au contraire diminuée et l'augmentation de l'excrétion potassique paraît en rapport avec cette diminution. Ces auteurs suggèrent que le passage du potassium dans le liquide tubulaire pourraît être favorisé par l'accroissement du débit et de la concentration tubulaire du sodium.

La nature et l'importance des transferts d'eau et d'ions Na^+ et K^+ permettraient selon PERSSON (1970) de distinguer deux parties dans le tubule distal :

- une partie initiale, faisant suite à l'anse de HENLE, imperméable à l'eau, dans laquelle la réabsorption du sodium est importante (elle correspond à la partie corticale du segment de dilution)
- une partie terminale, reliée au tube collecteur, perméable à l'eau, où la réabsorption du sodium, moins importante, se produit par échange contre du potassium (PERSSON 1970).

Il est bon de noter que du potassium peut être réabsorbé dans la partie initiale du tubule distal (KAHN et coll. 1971) ainsi que dans l'anse de HENLE (MALNIC et coll. 1966, DIRKS et SEELY 1970, MORGAN et coll. 1970); ces transferts sont de faible importance.

Les bicarbonates sont également réabsorbés à ce niveau suivant un mécanisme apparenté à celui qui existe dans le tubule proximal. Les ions bicarbonate formés à l'intérieur des cellules tubulaires distales accompagnent les ions Na^+ lors de leur réabsorption à partir de divers composés (phosphate disodique, chlorure). La fraction réabsorbée dans le tubule distal représente moins de 10 % du bicarbonate filtré.

L'eau est entraînée dans l'espace interstitiel par un gradient osmotique; la rapidité de réalisation de cet équilibre est fonction de la sécrétion d'A.D.H..

L'A.D.H., dont l'action est liée à l'augmentation du taux d'A.M.P. cyclique intracellulaire, accroît la perméabilité de la membrane de la face apicale (JARD 1971).

La réabsorption distale, soumise à l'action hormonale, est variable suivant les besoins de l'organisme; c'est pourquoi elle est dite facultative.

E. Fonction du tube collecteur.

La cellule du tube collecteur possède les mêmes propriétés que la cellule tubulaire distale et peut assurer les mêmes fonctions. Cependant les effets produits au niveau du tube collecteur sont sensiblement différents du fait que ce segment traverse un milieu d'osmolarité croissante.

Le liquide qui pénètre dans le tube collecteur est sensiblement isotonique par rapport au plasma.

Si les cellules de la paroi ont été rendues perméables à l'eau par l'action de l'A.D.H., le contenu tubulaire libère de l'eau dans le milieu interstitiel pour réaliser l'équilibre osmotique et l'urine définitive est hypertonique.

En l'absence de sécrétion d'A.D.H., le tube est imperméable; l'urine ne peut se concentrer et sa dilution peut même augmenter par suite de la réabsorption active du sodium.

Le tube collecteur fonctionne donc surtout comme un échangeur osmotique dont le rôle, complémentaire de celui de l'anse de HENLE, est d'assurer, sous contrôle hormonal, la concentration et la dilution de l'urine.

F. Régulation de l'équilibre électrolytique.

La régulation de l'équilibre électrolytique est assurée par les différents mécanismes dont nous avons parlé. Elle s'exerce par l'intermédiaire des nerfs vasomoteurs qui règlent la filtration et de l'aldostérone qui gouverne en grande partie la réabsorption tubulaire. La sécrétion d'aldostérone s'effectue sous le contrôle des centres intégrateurs et met en jeu des mécanismes complexes.

G. Régulation de l'équilibre hydrique.

La régulation de l'équilibre hydrique s'effectue par un mécanisme fondamentalement différent du précédent, mais cependant en étroite relation avec lui. Nous avons souligné le rôle primordial de l'A.D.H. dont la sécrétion par l'hypophyse postérieure dépend de nombreux influx dont ceux qui proviennent d'osmorécepteurs et de volorécepteurs.

La régulation de la volémie et de l'osmolarité nécessite également l'intervention de l'appareil juxta-glomérulaire, qui régit

la production de rénine, puis d'angiotensine dont l'action vasoconstrictrice augmente la pression artérielle et par conséquent le débit de filtration.

H. Régulation de l'équilibre acido-basique.

L'élimination des ions H^+ produits par l'organisme et le maintien du pH humoral sont assurés en grande partie par le rein. Divers mécanismes entrent en jeu à ce niveau; ce sont principalement :
- la sécrétion d'ions H^+ échangés contre des ions Na^+ à partir des sels acides des systèmes tampons qui entraîne une augmentation du taux des bicarbonates plasmatiques,
- l'ammoniogénèse qui forme des ions NH_4^+ par association des ions H^+ et de l'ammoniaque produite dans la cellule à partir, entre autres, de la glutamine.

I. Transport actif des ions.

Les données expérimentales de la physiologie cellulaire conduisent à admettre l'existence de processus de transports actifs d'ions en vue d'assurer leur réabsorption ou leur sécrétion.

L'extrusion du sodium de la cellule tubulaire est un phénomène actif au niveau proximal comme au niveau distal ainsi qu'au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE.

De même, la réabsorption distale du potassium à partir de la lumière fait appel à des processus actifs (MALNIC et coll. 1966).

Le départ du chlore de la branche ascendante constitue également un processus actif qui pourraît être la cause principale de la réabsorption du NaCl à ce niveau (BURG et GREEN 1973 b, ROCHA et KOKKO 1973).

Le mécanisme intime des "pompes ioniques" qui assurent ces transferts est encore très mal connu et fait l'ojet de nombreuses hypothèses.

L'importance du métabolisme aérobie a été soulignée par WENSTEIN et coll. (1969 2 ref.).

Le rôle de l'ATPase Na-K reste encore mal défini.

La participation de cet enzyme aux transferts actifs du sodium et du potassium à travers les membranes cellulaires a été mise en évidence par SKOU (1963, 1965).

L'ATPase est capable, en présence d'ions Mg^{2+}, d'hydrolyser l'ATP et de libérer l'énergie nécessaire pour l'échange actif du sodium contre du potassium à travers la membrane cellulaire; son action est inhibée par la ouabaïne.

L'intervention de l'ATPase Na-K dans les processus rénaux de réabsorption et d'échange a été prouvée par de multiples observations; elle a fait l'objet d'un grand nombre de travaux rapportés par LANDON et FORTE (1971), ORLOFF et BURG (1971), MARTINEZ et coll. (1972).

L'activité ATPasique est élevée au niveau des membranes basales des cellules tubulaires. SCHMIDT et DUBACH (1971) indiquent, chez le rat, les valeurs suivantes exprimées en moles de phosphate libéré par kg de poids sec et par heure à 37 °C :

Glomérule	1,55
Tubule contourné proximal	1,56
Portion droite du tubule proximal	0,28
Segment de dilution médullaire interne	12,10
Segment de dilution médullaire externe	6,10
Tubule contourné distal	7,88
Tube collecteur	6,27

Ces résultats font apparaître que l'activité ATPasique Na-K est relativement plus élevée dans le tubule contourné distal que dans le tubule contourné proximal, à l'inverse de la réabsorption du sodium.

Diverses autres considérations, en particulier des mesures électrophysiologiques, ont conduit WHITTEMBURY (1968) à envisager que la réabsorption du Na pourrait s'effectuer suivant deux processus différents,

définis par WHITTEMBURY (1968).

- l'un couplé avec l'entrée du potassium dans la cellule, associé à l'activité ATP-asique Na-K et sensible à la ouabaïne, intervenant principalement au niveau distal,

- l'autre insensible à la ouabaïne, contribuant à la réabsorption du sodium, du chlore et secondairement de l'eau, intervenant principalement au niveau proximal.

Le rôle de l'ATP-ase Na-K dans le second processus serait de moindre importance et ne constituerait que l'un des facteurs du transfert actif du sodium. Ce point de vue est aujourd'hui abandonné.

Les résultats rapportés par SCHMIDT et DUBACH révèlent en outre une activité ATP-asique élevée dans la branche ascendante de l'anse de HENLE, principalement dans la partie médullaire interne du segment de dilution, qui semblerait en relation avec l'importance des transferts actifs de sodium.

BURG et GREEN (1973 b) estiment que, dans la branche ascendante, l'ATP-ase Na-K assure principalement l'entrée du potassium dans la cellule tubulaire mais n'intervient guère dans le transport transépithélial du sodium. Ces auteurs ont montré que l'inhibition par la ouabaïne de l'activité ATP-asique Na-K dans la partie épaisse de la branche ascendante de l'anse de lapin s'accompagnait d'une diminution de la réabsorption active du chlore. La ouabaïne pourrait donc exercer sur le transport du Cl^- soit une action inhibitrice directe, soit une action indirecte secondaire à la diminution des transferts cellulaires Na-K.

Suivant les conceptions de BURG et GREEN, l'ATP-ase Na-K pourrait donc également constituer l'un des facteurs du "pompage" actif du chlore dans la branche ascendante.

Dans une étude récente, ZINS (1973) signale que l'augmentation du taux d'AMP cyclique dans les cellules tubulaires rénales

est susceptible de diminuer la réabsorption proximale du sodium. Cette observation indique que ce composé peut jouer un rôle dans le transport actif du Na suivant un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé.

Par ailleurs, l'AMP cyclique intracellulaire rénal agit en qualité de messager de l'action hormonale de l'ADH au niveau des cellules cibles et favorise ainsi la réabsorption de l'eau dans les parties distales du néphron.

En tout état de cause, comme l'ont montré GYORI et KINNE (1971) et YOSHIDA et coll. (1971) chez le rat, l'ATP semble constituer la principale source de l'énergie nécessaire aux mécanismes de transports actifs des ions.

Les transferts ioniques nécessitent également l'intervention de protéines de transport, qui représenteraient 5 % des protéines de la membrane cellulaire rénale (LANDON et FORTE 1971).

Les différents aspects de ces problèmes ont été récemment évoqués par MOREL et de ROUFFIGNAC (1973) et par ZINS (1973). Ils seront reconsidérés lorsque nous rendrons compte des modalités d'action des différents types de diurétiques.

2. CLEARANCES RENALES.

Le pouvoir épurateur du rein pour une substance déterminée peut s'exprimer par la "clearance" rénale ou coefficient d'épuration plasmatique de cette substance.

La "clearance" C d'une substance représente la valeur théorique en ml de plasma que le rein peut entièrement épurer de la substance considérée en une minute.

Soient P la concentration plasmatique de la substance
U sa concentration urinaire
V le débit urinaire en ml/minute.

D'après la définition que nous en avons donnée, la clearance de la substance s'exprime en ml/minute par le rapport : $C = \frac{U \times V}{P}$.

Cette notion peut s'appliquer à toute substance excrétée par le rein, lorsqu'elle n'est ni catabolisée, ni fixée par certains organes.

Certaines substances telles que l'inuline, le mannitol, la créatinine, le thiosulfate de Na ne sont introduites dans le néphron que par filtration glomérulaire et ne sont pas réabsorbées. Leur clearance représente donc le débit de filtration glomérulaire.

D'autres substances, comme l'acide para-aminohippurique (P.A.H.), le diodrast sont à la fois filtrées au niveau du glomérule et sécrétées au niveau du tubule proximal. Aux faibles concentrations plasmatiques (inférieures à 100 mg/l pour le P.A.H.), le rein débarrasse le plasma qui le traverse de la quasi-totalité de ces substances. Leur clearance représente alors le débit plasmatique rénal.

Toute substance dont la clearance est supérieure au débit de filtration glomérulaire est l'objet d'une sécrétion tubulaire. Par contre, si la clearance est inférieure au débit de filtration glomérulaire, la substance subit une réabsorption tubulaire.

Les différents aspects de l'étude des clearances ont été développés dans une communication antérieure (DARTIGUES 1971); nous n'évoquerons ici que les points qui présentent une importance particulière pour nos investigations.

La notion de clearance peut être étendue à l'eau et aux substances osmotiquement actives.

On peut définir la clearance osmolaire C_{osm} comme le rapport :

$$C_{osm} = \frac{U_{osm} \times V}{P_{osm}}$$

U_{osm} et P_{osm} représentant les osmolarités respectives de l'urine et du plasma.

La clearance osmolaire représente le volume théorique en ml de plasma que le rein peut épurer de ses substances dissoutes en une minute.

On voit immédiatement que :

- si l'urine est isotonique au plasma, on a $C_{osm} = V$
- si l'urine est hypotonique $C_{osm} < V$
- si l'urine est hypertonique $C_{osm} > V$

Chez l'animal ayant reçu une surcharge hydrique, la sécrétion d'ADH est supprimée et les tubes collecteurs sont alors imperméables à l'eau. Il s'établit une diurèse, dite diurèse aqueuse, au cours de laquelle s'élimine une urine distale hypotonique. V est supérieur à C_{osm} et la différence $V - C_{osm}$ représente la clearance de l'eau libre que l'on désigne par C_{H2O}.

Comme l'urine proximale est isotonique, la clearance de l'eau libre exprime la réabsorption par le rein des substances dissoutes, principalement du sodium, indépendamment de leur solvant; elle représente donc la fonction de dilution du rein.

L'eau libre se forme dans le segment de dilution où le sodium (ou le Cl) se trouve réabsorbé en excès par rapport à l'eau. Au niveau médullaire, le sodium réabsorbé participe au maintien du gradient osmotique cortico-papillaire, tandis qu'au niveau cortical il n'y contribue pas.

Pendant la diurèse aqueuse maximale, le volume de filtrat quittant le segment de dilution représente sensiblement le volume urinaire émis (la formation d'eau libre dans le tubule distal et la diffusion d'eau libre à partir du tube collecteur sont alors négligeables).

Chez un animal en état d'hydropénie par suite de restriction hydrique, la sécrétion d'ADH est importante et les tubes collecteurs sont plus perméables à l'eau. Il s'élimine donc une faible quantité d'urine hypertonique. V est inférieur à C_{osm} et la différence $C_{osm} - V$ représente la réabsorption ou transport de l'eau libre que l'on désigne classiquement par TC_{H2O} et qui n'est autre que C_{H2O} changé de signe. Cette valeur exprime la réabsorption par le rein de l'eau indépendamment des substances dissoutes; elle représente donc la fonction de concentration du rein.

La réabsorption de l'eau libre s'effectue principalement au niveau du tube collecteur par action osmotique; elle ne peut donc se

produire que s'il existe un gradient de concentration cortico-papillaire. La réabsorption de l'eau libre peut également s'effectuer après l'administration d'une surcharge saline, bien que le gradient soit alors moins marqué, alors que la perméabilité tubulaire se trouve augmentée (ADH).

Ces notions de clearance et de réabsorption de l'eau libre ont été introduites en 1952 par WESSON et ANSLOW.

La détermination des clearances présente un grand intérêt en pathologie et en pharmacologie rénales.

La modification de la filtration glomérulaire, ainsi que celle du débit plasmatique rénal peuvent être mises en évidence respectivement par la mesure des clearances correspondantes. La possibilité d'excrétion tubulaire d'une substance peut également être révélée à partir de mesures de clearances. La filtration et la réabsorption de l'eau et du sodium peuvent être calculées par le moyen des clearances.

L'étude des variations, sous l'action d'un diurétique, du débit urinaire, de la clearance osmolaire, de la clearance et de la réabsorption de l'eau libre permet, dans une certaine mesure, de localiser l'action de ce produit. Sur ce principe est fondée la "méthode des clearances" que nous exposerons ultérieurement.

Enfin, la détermination de la clearance d'un produit peut fournir des renseignements intéressants sur son comportement au niveau du néphron.

3. ACTION PHARMACOLOGIQUE DES DIURETIQUES.

Les effets des diurétiques sont très variables suivant les mécanismes par lesquels ils agissent et suivant le lieu où s'exerce leur action.

Nous exposerons en premier lieu quelques principes généraux, puis nous définirons, pour chacune des principales classes de diurétiques, les effets et les mécanismes d'action.

A. Principes généraux de l'action diurétique.

L'action diurétique peut résulter soit d'une augmentation de la filtration glomérulaire, soit d'une diminution de la réabsorption des ions et de l'eau. S'il est relativement facile de définir la nature d'une telle action, il est en général difficile de la localiser dans le néphron et d'en préciser les modalités au niveau cellulaire.

Pour certains types de diurétiques les mécanismes d'action peuvent facilement se concevoir; c'est notamment le cas des inhibiteurs enzymatiques ou hormonaux (inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, de l'aldostérone, de l'ADH). Leur action se localise sans difficultés en tous les points où agissent les substances biologiques antagonistes.

Cependant, pour la majeure partie des diurétiques, l'action résulte d'une inhibition de la réabsorption des ions, principalement du sodium. Dans ces cas les mécanismes inhibiteurs au niveau cellulaire restent le plus souvent hypothétiques.

Selon BANK (1968), un composé ne serait en mesure de produire des effets importants sur l'excrétion du sel et de l'eau qu'à la condition que son action s'exerce au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE. Ce principe se fonde sur des arguments expérimentaux qui démontrent la capacité que possède ce segment de modifier ses caractéristiques hydrodynamiques et ses facultés de réabsorber le NaCl pour amortir les effets d'un produit agissant à un niveau différent.

D'après une mise au point de ZINS (1971), les diurétiques pourraient agir au niveau cellulaire suivant plusieurs modalités dont les principales seraient :

- l'augmentation du retour des ions, par diffusion à travers la membrane basale, du milieu interstitiel vers l'intérieur de la cellule,

- la diminution de la capacité de production d'énergie utilisable,

- la diminution de la possibilité d'utilisation des molécules riches en énergie,

- l'inhibition du passage des ions, par diffusion à travers la membrane apicale, de la lumière tubulaire vers l'intérieur de la cellule.

La première de ces possibilités est accréditée par des expériences utilisant la peau de grenouille, la vessie de crapaud et les tubules proximaux de rat. L'augmentation du flux de retour du sodium pourrait résulter d'une action du produit sur les groupements -SH de la membrane basale, qui provoquerait l'apparition de charges négatives favorisant le passage des ions Na^+ vers l'intérieur de la cellule. On a pu ainsi observer un gonflement des cellules de coupes de reins traitées par l'acide éthacrynique, tandis que leur consommation d'oxygène restait normale (LANDON et FITZPATRICK 1970).

De nombreux arguments révèlent une inhibition par les diurétiques du métabolisme rénal oxydatif et anaérobie. De tels effets n'ont cependant pu être démontrés de manière satisfaisante chez l'animal intact après administration de doses thérapeutiques.

Le lactate s'accumule dans la medulla et la papille de chiens traités par différents diurétiques, ce qui traduit une inhibition à ces niveaux du métabolisme oxydatif. Cependant le métabolisme oxydatif contribue peu dans ces deux zones à la réabsorption du sodium. Par ailleurs le chlorothiazide, qui est l'un des produits entraînant l'accumulation du lactate dans la medulla et la papille, n'inhibe pas la réabsorption du sodium dans cette partie du rein.

La possibilité d'inhibition par les diurétiques de l'utilisation des molécules riches en énergie pour la réabsorption des ions a été largement étudiée. Les recherches ont porté tout particulièrement sur les modifications de l'activité ATP-asique Na-K. Or, si plusieurs diurétiques produisent une réduction de l'activité enzymatique, il n'est pas prouvé que ce caractère soit la cause principale de l'action pharmacologique. Seuls les effets diurétiques de la ouabaïne peuvent s'expliquer intégralement par une inhibition de l'ATP-ase Na-K rén[illegible]

Néanmoins, il est permis de penser que des composés tels que l'acide éthacrynique et le furosémide, qui augmentent les teneurs en ATP de la zone médullaire, modifient d'une manière ou d'une autre l'utilisation de l'énergie à ce niveau.

Comme nous l'avons déjà indiqué, ZINS (1973) signale que l'augmentation du taux d'AMP cyclique dans les cellules tubulaires rénales, sous l'effet d'activateurs de l'adénylcyclase ou d'inhibiteurs de la phosphodiestérase, s'accompagne dans certains cas de manifestations diurétiques. Ce type d'action semble résulter d'une diminution de la réabsorption proximale du sodium. Une telle observation ne permet cependant pas d'expliquer l'action diurétique de composés tels que les thiazides qui sont des inhibiteurs connus de la phosphodiestérase mais qui n'agissent pas au niveau proximal. Il n'est pas exclu par contre que la théophylline, qui est également un inhibiteur de la phosphodiestérase, exerce en partie son action suivant ce schéma.

B. Diurétiques osmotiques.

Les diurétiques osmotiques sont des substances qui échappent à la réabsorption iso-osmotique proximale et qui entraînent à leur suite l'eau qui leur est osmotiquement liée ainsi que les électrolytes en solution, de telle sorte que le liquide tubulaire reste iso-osmotique par rapport au plasma.

Leur action se caractérise donc par une augmentation du volume urinaire et accessoirement par un accroissement de l'excrétion saline.

Peuvent jouer ce rôle des substances qui ne peuvent être réabsorbées, comme le mannitol, ou qui le sont incomplètement, ou encore des substances en excès tel que leur réabsorption ne puisse se réaliser normalement (sels, glucose, urée, etc...).

La diurèse osmotique peut également être d'origine pathologique; c'est le cas du diabète et de la maladie d'ADDISON (le sel et le sucre entraînent avec eux l'eau qui leur est "liée").

C. Diurétiques xanthiques.

Les diurétiques xanthiques (caféine, théophylline, théobromine) entraînent une augmentation de la diurèse aqueuse et saline.

Le mécanisme de leur action est assez mal défini. Ils provoquent une vaso-dilatation des artérioles afférentes au glomérule, ce qui a pour effet d'augmenter l'irrigation locale et la filtration glomérulaire.

Il est possible que ces méthyl-xanthines, qui sont des inhibiteurs de la phosphodiestérase, exercent en partie leur action en provoquant une accumulation intracellulaire d'AMP cyclique qui a pour effet de diminuer la réabsorption proximale du sodium (ZINS, 1973).

D. Diurétiques mercuriels.

Avant la découverte du furosémide et de l'acide éthacrynique, les diurétiques mercuriels furent très utilisés en raison de leurs effets importants.

Malgré de nombreuses études, le mécanisme de leur action reste mal connu.

Il semble qu'ils puissent agir sur toute la longueur du néphron, principalement au niveau du segment de dilution et du tubule distal (BANK, 1968).

La mise en évidence de propriétés inhibitrices de l'activité ATP-asique Na-K (LANDON et NORRIS 1963, TAYLOR 1963) semblait devoir rendre compte des modalités d'action de ces composés. Les études ultérieures à partir de dérivés mercuriels et d'autres types de diurétiques ont fait apparaître le manque de corrélation entre l'activité diurétique et l'inhibition de l'action enzymatique (HOOK et WILLIAMSON 1965 b, LANDON et FORTE 1971).

Certains diurétiques mercuriels, qui inhibent l'activité ATPasique chez le rat in vivo, exercent leur action chez le chien sans modifier l'activité de l'enzyme.

L'action de ces composés paraît en relation avec leur possibilité de liaison avec les protéines rénales au niveau de leurs groupements -SH (CAFRUNY et coll. 1955, CAFRUNY et FARAH 1956). Cependant, certains dérivés mercuriels organiques, comme le para-chloro-mercuribenzoate, peuvent se lier sans exercer d'action diurétique (KESSLER et coll. 1957). L'activité diurétique dépendrait du mode de liaison (BURG et GREEN 1973 a).

Selon BURG et GREEN (1973 a), le Mersalyl ainsi que d'autres diurétiques mercuriels inhiberaient le transport actif du chlore dans la partie large de la branche ascendante de l'anse de HENLE chez le lapin.

L'action des composés mercuriels se caractérise par une augmentation importante du volume urinaire et de l'excrétion de chlorure, une élévation plus discrète de l'élimination du sodium, une acidification de l'urine, une augmentation de l'excrétion potassique dans la mesure où elle est initialement basse (MUDGE et coll. 1950).

Ces diurétiques ne sont pas dépourvus de toxicité. Leur usage prolongé fait apparaître une alcalose hypochlorémique qui limite leurs effets. Ils sont actuellement peu utilisés.

Il importe de noter qu'ils sont peu actifs et relativement toxiques chez le rat.

E. Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique.

Les composés appartenant à cette classe exercent leur action principalement par inhibition in vivo de l'anhydrase carbonique. Ils empêchent donc l'hydratation du CO2 intracellulaire et, par voie de conséquence, la sécrétion active des ions H^+ dans la lumière tubulaire ainsi que la réabsorption de l'ion bicarbonate.

L'action de ces composés se caractèrise principalement par une élimination importante d'ions bicarbonate et par une alcalinisation de l'urine. Les éliminations du sodium et de l'eau sont corrélativement augmentées, tandis que l'excrétion du chlore est généralement peu affectée ou même diminuée. L'élimination du potassium se trouve également augmentée, ce qui peut s'expliquer par l'existence d'un phénomène de compétition entre les ions H^+ et K^+ au niveau du système d'excrétion (BERLINER et coll. 1951).

Les représentants les plus typiques de cette série de diurétiques sont l'acétazolamide et son dérivé méthylé, le méthazolamide.

Il est permis de penser que l'action de ces produits se situe aux points où intervient l'enzyme, c'est à dire principalement au niveau du tubule proximal et accessoirement au niveau du tubule distal. ROSIN et coll. (1970) estiment que l'acétazolamide n'exerce aucune action au niveau du segment de dilution.

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique voient leur action limitée par l'acidose hyperchlorémique qu'ils provoquent. Ils sont actuellement peu utilisés.

F. Benzothiadiazines et sulfonamides d'action voisine.

La recherche de nouveaux diurétiques sulfamidés a conduit à la découverte du chlorothiazide, de diverses benzothiadiazines et d'autres composés qui exercent une action différente de celle de l'acétazolamide.

Bien que légèrement inhibiteurs in vivo de l'anhydrase carbonique et favorisant par conséquent l'élimination du bicarbonate et l'alcalinisation de l'urine, ils exercent une action particulière se traduisant par une augmentation importante de l'excrétion ionique, principalement du chlorure de sodium; ce sont des saliurétiques.

Ces effets résultent d'une inhibition de la réabsorption du sodium dans la partie corticale du segment de dilution (KREBS 1948,

HEINEMANN et coll. 1959, EARLEY et coll. 1961, SUKI et coll. 1965, WILSON et KIRKENDALL 1970).

Le mécanisme de leur action est mal connu. LANDON et FITZPATRICK (1970) ont montré que le chlorothiazide diminuait in vitro la quantité de groupements -SH titrables, ce qui révèle sa capacité de liaison avec les protéines. Selon KUNAU (1972) le benzolamide diminuerait la réabsorption proximale de l'ion chlorure.

Au cours de l'action diurétique, le gradient osmotique cortico-papillaire n'est pas modifié, ce qui explique que l'augmentation du volume urinaire reste modérée.

Parmi les benzothiadiazines, les composés les plus importants sont le chlorothiazide et son dérivé hydrogéné, l'hydrochlorothiazide, qui produit des effets saliurétiques dix fois plus importants. Parmi les autres composés, nous pouvons citer le méfruside, le clopamide, le diapamide, le métazolone, tous utilisés en thérapeutique.

Remarques :

1°) La plupart des composés sulfamidés cycliques possèdent à des degrés divers la propriété d'inhiber in vitro l'anhydrase carbonique, mais leur action in vivo est très variable. D'après CRAWFORD et coll. (1960), seuls les dérivés dont le cycle ne porte aucun substituant en position ortho par rapport au groupement $-SO_2NH_2$ possèdent la propriété d'inhiber l'enzyme in vivo. Cette théorie rend compte des effets respectifs de l'acétazolamide et du chlorothiazide. Il existe par ailleurs de nombreux dérivés benzéniques et thiophéniques, tels que le dichlorphénamide et le thiophéne-2 sulfonamide, qui exercent une action mixte, c'est à dire qui se comportent à la fois comme d'importants inhibiteurs in vivo de l'anhydrase carbonique et comme des saliurétiques.

2°) BEYER (1958) estime que le caractère de la diurèse est conditionné par la répartition du produit inhibiteur entre le tubule rénal et les érythrocytes, l'action purement saliurétique étant favorisée par une forte concentration tubulaire.

3°) CRAWFORD signale également que la substitution de l'un ou des deux hydrogènes de la fonction sulfamide supprime toute activité diurétique, ce qui démontre le rôle majeur de cette fonction vis à vis de l'élément cible, quelles que soient les modalités de l'action diurétique.

G. Furosémide.

Bien que possédant une fonction - SO_2NH_2, le furosémide présente des propriétés particulières qui le différencient nettement des composés sulfamidés apparentés au chlorothiazide et à l'acétazolamide.

Son action se caractérise par une diurèse abondante et rapide s'accompagnant d'une élimination massive de chlorure de sodium. L'excrétion du potassium et celle des ions H^+ se trouvent légèrement augmentées. Les urines sont acides, isotoniques au plasma et l'excrétion du chlore l'emporte sur celle du sodium.

De nombreuses recherches ont permis d'établir que son action s'exerce sur toute la longueur du tubule rénal et principalement au niveau du segment de dilution (SUKI et coll. 1964, VORBURGER 1964, HOOK et WILLIAMSON 1965 c, SUKI et coll. 1965, SELDIN et coll. 1966, LARAGH et coll. 1966, SIEDEL et coll. 1967, SMALL et CAFRUNY 1967, RADO et coll. 1969, BRENNER et coll. 1969, MORGAN et coll. 1970). L'inhibition de la réabsorption du sodium dans la partie médullaire du segment de dilution provoque la disparition du gradient cortico-papillaire (HOOK et WILLIAMSON 1965 c, IMBS et coll. 1970, STOWE et HOOK 1970). Son action peut en outre se rapporter partiellement à une augmentation du flux sanguin rénal.

Le mécanisme d'action cellulaire du furosémide reste mal connu. KARGER (1967) suggère que l'action du produit pourrait résulter d'une abolition de la perméabilité membranaire aux anions. D'après SCHMIDT et DUBACH (1970, 1971), le furosémide réduirait l'activité ATPasique Na-K, sans qu'il soit possible de rattacher son activité diurétique à une telle action. LANDON et FITZPATRICK (1970) ont mis en évidence une diminution in vitro, sous l'effet du produit, de la somme des groupements -SH titrables. BURG et coll. (1973) ont révélé une action inhibitrice sur la réabsorption active du Cl^- dans la branche ascendante de l'anse de HENLE.

Les résultats de nombreux travaux, rapportés par LANDON et FORTE (1971), permettent de penser que l'inhibition de la réabsorption du sodium résulterait d'une diminution de la perméabilité tubulaire plutôt que d'une altération du système de transport.

Les effets du furosémide sont susceptibles de provoquer une alcalose hypochlorémique qui n'entrave pas l'action du produit. Ils peuvent également induire une hypokaliémie ainsi qu'une hyperuricémie.

H. Acide éthacrynique.

Chimiquement différent du furosémide, l'acide éthacrynique lui est étroitement apparenté sur le plan pharmacologique. Les effets de ces deux produits sont comparables dans leur ensemble.

L'action de l'acide éthacrynique, comme celle du furosémide, est très étendue et s'exerce surtout au niveau de la partie médullaire du segment de dilution, provoquant la disparition du gradient cortico-papillaire (BAER et coll. 1964, BEYER et coll. 1965, KOMORN et CAFRUNY 1965, GOLDBERG 1966, LARAGH et coll. 1966).

Le mécanisme d'action cellulaire de l'acide éthacrynique reste lui aussi mal connu.

L'étude de son action chez le rat a permis des observations intéressantes. Il est en effet inactif chez cet animal lorsqu'il est administré per os (LARAGH et coll. 1966) alors qu'il manifeste une activité lorsqu'il est administré par voie intraveineuse (ZINS et coll. 1968). DIBONA (1971) a étudié les effets chez le rat par les techniques de microponctions.

Nombreux sont les travaux sur l'action de l'acide éthacrynique sur l'activité ATPasique Na-K rénale (DAVIS 1970, LANDON et FORTE 1971). HOOK et WILLIAMSON (1965 b) ont montré que le produit inhibait l'activité de l'enzyme dans le rein du rat, mais qu'il n'existait pas de corrélation satisfaisante entre cette action et l'activité natriurétique. BANERJEE et coll. (1970) considèrent que l'action inhibitrice

sur l'activité ATPasique se manifeste suivant deux modalités: le produit empêche la réaction de déphosphorylation de l'ATP; il agit également sur l'intermédiaire phosphorylé dont il diminue l'affinité apparente pour K^+.

DUGGAN et NOLL (1972) ont observé sur le rein de chien une inhibition de l'activité ATPasique qui était également produite par certains composés thioliques. Selon NECHAY et CONTRERAS (1972), la résistance relative du rat à l'action de l'acide éthacrynique pourrait être en relation avec la réversibilité de l'action enzymatique.

YOSHIDA et coll. (1971) ont montré que le produit inhibait chez le rat le système de transport des électrons et qu'il réduisait la formation d'ATP.

KOMORN et CAFRUNY (1965) ont mis en évidence une diminution de la quantité de groupements -SH titrables dans les reins de chiens traités par l'acide éthacrynique; ils n'ont pas observé ce phénomène chez le rat insensible à l'action du produit. EPSTEIN (1972 a et b), à partir de l'étude des effets de composés voisins, n'a pu établir de bonne corrélation entre la réactivité vis à vis des groupements -SH et l'activité diurétique.

Certains travaux rapportés par LANDON et FORTE (1971) attribuent les effets de l'acide éthacrynique à une diminution de la perméabilité au sodium du tubule rénal.

Les effets secondaires sont comparables à ceux du furosémide.

La différence d'action chez le rat et le fait que leurs effets ne sont pas additifs aux faibles doses permettent de penser que le furosémide et l'acide éthacrynique agissent suivant des mécanismes différents.

D'autre dérivés cétoniques $\alpha.\beta$insaturés possèdent des propriétés voisines.

I. Spirolactones.

Administrées à l'animal entier, les spirolactones provoquent une diurèse aqueuse et chlorurée sodique, s'accompagnant d'une rétention de potassium.

Ce sont des inhibiteurs compétitifs de l'aldostérone qui exercent leur action en tous les points où intervient cette hormone. Ce sont également des antagonistes des minéralo-corticoïdes.

Ils diminuent secondairement l'excrétion des ions H^+, K^+ et NH_4^+.

Ils sont dépourvus d'activité chez l'animal surrénalectomisé.

J. Triamtérène et Amiloride.

Ces substances exercent des effets comparables à ceux des spirolactones, mais elles agissent par un mécanisme différent. Elles sont en effet actives chez l'animal surrénalectomisé et ne peuvent de ce fait être considérées comme des inhibiteurs de l'aldostérone. Il est permis de penser qu'elles bloquent les échanges Na^+-K^+ (BALL et GREENE 1963, BAER et coll. 1967). Elles diminuent également l'excrétion des ions H^+.

Il faut noter que le triamtérène et l'amiloride, comme les spirolactones, peuvent accroître les effets saliurétiques des thiazides, du furosémide et de l'acide éthacrynique, tout en s'opposant à leur action kaliurétique.

Il existe de nombreux composés possédant des propriétés voisines parmi les ptéridines (triamtérène), les pyrazines (amiloride), les pyrimidines et les triazoles.

K. Inhibiteurs de l action de l'A.D.H..

L'eau administrée en excès ainsi que l'éthanol font cesser la libération endogène centrale d'A.D.H., ce qui les fait souvent considérer à tort comme des inhibiteurs de l'hormone.

Leur action se traduit par une imperméabilisation des segments distaux qui entraîne une diurèse aqueuse ne s'accompagnant d'aucune augmentation de l'excrétion des électrolytes.

Certaines phénothiazines possèderaient la propriété d'être des inhibiteurs de l'A.D.H..

L. Diurétiques divers.

De nombreuses substances de structures chimiques diverses ont été reconnues douées d'activité diurétique. Citons parmi elles la triflocine, dérivé de l'acide nicotinique, dont les effets sont voisins de ceux du furosémide et de l'acide éthacrynique.

M. Tableau général.

Les effets des principaux types de diurétiques sont schématisés dans le tableau suivant (tableau I. 1.),

Tableau I. 1.

Effets des principaux types de diurétiques

Principales classes de diurétiques	pH	Volume	Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-
Diurétiques osmotiques	0	+++	++	0	++	0
Diurétiques xanthiques	0	++	++	0	++	0
Organo-mercuriels	-	+++	++	±	+++	-
Inhibiteurs de l'A.C.	+++	++	+	++	0	+++
Benzothiadiazines	+	++	++	+	++	+
Furosémide	-	+++	+++	+	+++	0
Acide éthacrynique	-	+++	+++	+	+++	-
Spirolactones	+	+	+	-	+	±
Triamtérène, amiloride	+	+	+	-	+	0
Inhibiteurs de l'A.D.H.	0	++	0	0	0	0

+ : Augmentation proportionnelle au nombre de signes

- : Diminution

0 : Sans effet

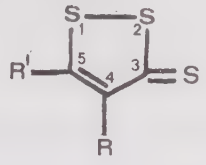
L'étude des effets d'un produit nouveau sur l'excrétion hydro-électrolytique permet donc, en première analyse, de le situer par rapport aux principaux types de diurétiques.

II. GENERALITES SUR LES DERIVES DE LA DITHIOLE-1,2 THIONE-3.

1. FORMULE GENERALE - HISTORIQUE.

Parmi les dérivés soufrés de synthèse, les dithiole-1,2 thione-3 occupent une place importante en raison de leurs caractères chimiques particuliers.

Ces composés répondent à la formule générale :



Le premier dérivé de cette série, la diméthyl-4,5 dithiole-1,2 thione-3 a été préparée par BARBAGLIA (1884) à partir du soufre et de l'isovaléraldéhyde.

Le chauffage à température élevée de divers hydrocarbures éthyléniques en présence de soufre a permis la préparation de nombreux composés de cette série.

Parmi les travaux les plus importants, rapportés par BRESLOW et SKOLNIK (1966), LOZAC'H et VIALLE (1969), nous pourrions citer ceux de BAUMANN et FROMM, de BOTTCHER, LUTTRINGHAUS, LOZAC'H, GODIN, TESTE, VORONOV, BRAUN, KARPENKO, SCHMITT et LESPAGNOL, RAOUL et VIALLE KREBS et WEBER, etc...

2. NOMENCLATURE.

Plusieurs nomenclatures ont été proposées. Il semble que celle qui a été préconisée par LOZAC'H (1967) soit aujourd'hui communément admise. Ces composés sont appelés dithiole-1,2 thione-3; les positions dans le cycle sont numérotées comme il a été indiqué précédemment.

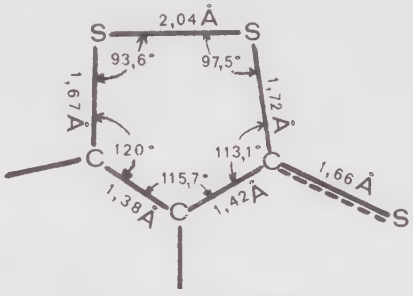
3. SYNTHESE.

La plupart des réactions qui conduisent à ces hétérocycles sulfurés utilisent l'action cyclisante du soufre élémentaire, du pentasulfure de phosphore ou encore l'action combinée des deux sur un squelette organique de structure appropriée dans différents solvants ou bien en phase vapeur (préparation industrielle).

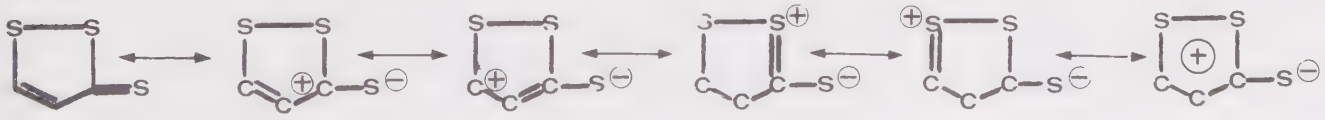
La chlorosulfonylation des aryl-5 et thiényl-5 dithiole-1,2 thiones-3 et ones-3 fournit des chlorures de sulfonyle à partir desquels il est possible de préparer des dérivés sulfamidés et sulfonés (TESTE et ANTOINE 1964, TESTE et DORANGE 1966, DORANGE et coll. 1973, DORANGE et VENIEN 1974, DORANGE 1975). De tels produits ont été utilisés dans notre travail.

4. STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE.

Les études réalisées par KEHL et JEFFREY, JEFFREY et SHIONO, dont les résultats sont rapportés par LANDIS (1965) ont permis de déterminer le géométrie du cycle par diffraction X, sur la méthyl-4 dithiole-1,2 thione-3.



Des formules limites de résonance sont souvent décrites pour rendre compte de certains aspects de la réactivité de l'hétérocycle, mais en toute rigueur la répartition électronique est beaucoup mieux représentée par la théorie des orbitales moléculaires.



La nature polaire du noyau dithiole-1,2 thione-3 a été confirmée par LUTTRINGHAUS qui a mesuré les moments dipolaires de plusieurs composés.

Le caractère électrophile, de même que la fragilité de l'hétérocycle en milieu basique fort ainsi que sa bonne stabilité en milieu acide sont communément reconnus et établis à partir de résultats expérimentaux. La nucléophilie du soufre thiocarbonyle a été mise en évidence par des réactions d'alkylations et la formation de complexes de coordination avec des métaux de la série de transition (PETILLON et GUERCHAIS 1971, PETILLON 1973).

Les spectres d'absorption infrarouge ont également fourni des renseignements intéressants sur la vibration du groupement thiocarbonyle C=S (BRESLOW et SKOLNIK 1966, LOZAC'H et VIALLE 1969, GENTRIC et SAUMAGNE 1972).

Les spectres électroniques présentent plusieurs bandes d'absorption vers 250-300 nm dans le domaine ultraviolet et une bande dans le bleu.

Le caractère attracteur de l'hétérocycle a été étudié par R.M.N. (DORANGE et coll. 1973, DORANGE et VENIEN 1974).

5. PROPRIETES PHYSIQUES.

Les dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 se présentent à l'état solide. Certains possèdent une odeur caractéristique rappelant celle des moisissures et qui peut être due à des impuretés. Leur goût est très amer. Leur couleur varie du jaune au rouge vif; les composés dans lesquels le groupement C=S est remplacé par un groupement C=O sont généralement de couleur jaune.

Les caractères de solubilité varient suivant la nature des substituants. En règle générale ces composés sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques, sauf s'ils possèdent des groupements hydrophiles. Plusieurs dérivés hydrosolubles à l'état de sels ont été préparés (TESTE et DORANGE 1966, TREBAUL 1970, DORANGE 1975).

Tous les dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 se dissolvent sans altération dans les acides minéraux concentrés.

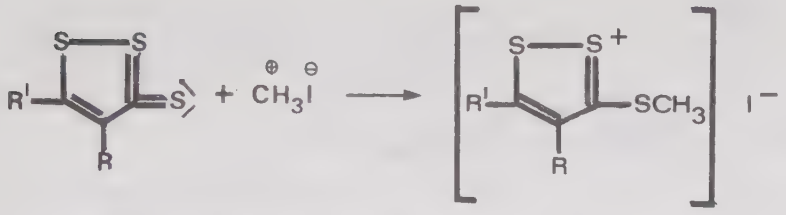
6. PROPRIETES CHIMIQUES.

Les propriétés chimiques des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 sont extrêmement nombreuses. Nous allons rapidement les

passer en revue car elles ne présentent qu'un intérêt mineur pour le travail que nous nous proposons de réaliser.

A. Formation de sels de thiodithiolylium.

Les caractères polaires de la dithiole-thione justifient la possibilité d'existence d'ions thiodithiolylium qui apparaissent au cours de nombreuses réactions. Ces ions sont plus colorés que les composés qui leur ont donné naissance.



Iodure de méthyl-thiodithiolylium

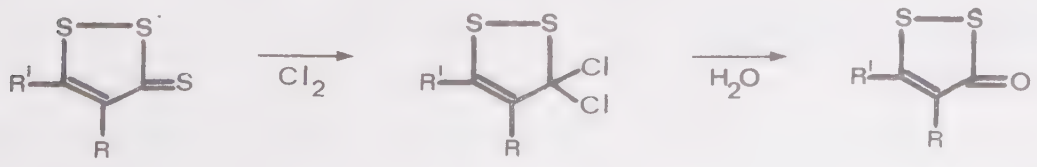
B. Réactions d'addition.

Les dithiole-thiones sont susceptibles de fournir des composés d'addition avec des halogénures et différents sels métalliques tels que le nitrate d'argent, le trichlorure d'or, le chlorure et le bromure mercuriques, le tétrachlorure d'étain, le tri- et le pentachlorure d'antimoine, le trichlorure de bismuth. Les chlorures de thionyle et de sulfuryle ainsi que la chlorhydrine sulfurique peuvent également donner des composés d'addition.

Les composés formés sont des complexes peu solubles dans les solvants organiques. Les complexes mercuriques insolubles permettent en particulier d'isoler les dithiole-thiones à partir des milieux de synthèse.

C. Réactions de substitution.

Les halogènes peuvent donner à chaud des réactions de substitution. Le chlore peut ainsi se substituer au soufre thiocarbonyle; par hydrolyse, le composé chloré fournit une dithiole-one.

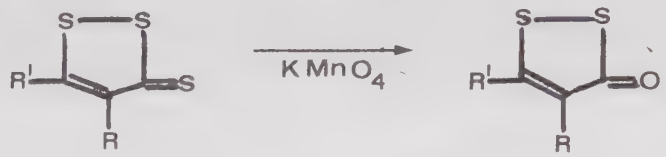


Dithiole-thione — Dérivé chloré — Dithiole-one

D. Réactions d'oxydation.

Les dithiole-thiones peuvent s'oxyder lentement à l'air suivant des réactions complexes. Les solutions aqueuses de dérivés hydrosolubles brunissent généralement au bout de quelques jours.

Malgré l'effet stabilisateur du groupement dithiole sur la fonction thione, celle-ci est oxydée en carbonyle sous l'action du permanganate de potassium ou de l'acétate mercurique en milieu acétone-acide acétique (BOTTCHER 1948).



Dithiole-thione Dithiole-one

Les dithiole-ones ainsi obtenues sont beaucoup moins colorées que les thiones correspondantes.

L'oxydation par l'eau oxygénée en milieu basique est beaucoup plus brutale et provoque la destruction du cycle avec production de sulfates.

E. Réactions de réduction.

En présence de catalyseurs, l'hydrogène peut ouvrir le cycle et donner naissance à divers composés saturés après élimination du soufre sous forme d'hydrogène sulfuré.

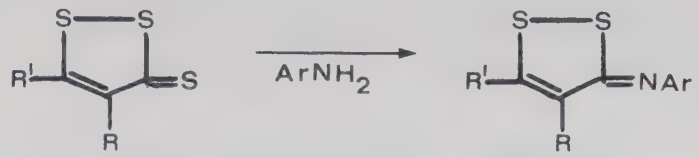
F. Action des bases fortes.

En milieu fortement basique, la couleur des solutions aqueuses devient plus foncée. A chaud on observe une fusion alcaline qui conduit à différents sulfures et mercaptans.

G. Réactions de condensation.

Les dithiole-thiones sont susceptibles de se condenser avec

les amines primaires aromatiques pour donner les imines correspondantes.



Dithiole-thione Dithiole-imine

Enfin les dithiole-thiones peuvent se condenser avec des molécules diverses pour former des produits plus élaborés.

7. CARACTERES ANALYTIQUES.

Les dithiole-thiones peuvent se caractériser par leurs propriétés spectrales U.V.- visible, I.R. et R.M.N..

Le réactif de GROTE (GROTE 1931) au pentacyanoaquoferrate trisodique $[Fe(CN)_5\ H_2O]\ Na_3$, donne avec les dithiole-thiones une coloration bleue ou verte qui se prête au dosage colorimétrique.

8. USAGES.

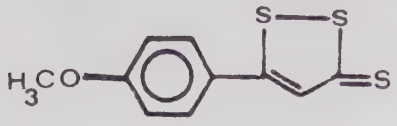
Les dithiole-thiones sont peu utilisées bien que de nombreux usages aient été préconisés (BRESLOW et SKOLNIK 1966, LOZAC'H et VIALLE 1969).

Certains de ces produits ont été proposés comme lubrifiants, stabilisateurs d'oxydation, inhibiteurs de corrosion, sensibilisateurs photographiques.

Des dithiole-ones chlorées ont été utilisées comme fongicides agricoles.

Bien qu'aucun produit de synthèse de cette série n'ait été reconnu doué de propriétés antibiotiques, il faut signaler l'existence du noyau dithiolo-1,2 pyrrole dans de nombreux dérivés extraits de plusieurs souches de streptomyces.

Un seul dérivé de la dithiole-1,2 thione-3 s'est révélé jusqu'ici intéressant en Pharmacologie. Il s'agit de la (méthoxy-4 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3 préparée par GAUDIN et LOZAC'H (1947) et BOTTCHER et LUTTRINGHAUS (1947).



(méthoxy-4 phényl)-5
dithiole-1,2 thione-3

Ce produit, commercialisé en France sous le nom de "SULFARLEM", est utilisé comme cholérétique.

Ses propriétés pharmacologiques ont été étudiées par KOURILSKY et GAUDIN (1947), HALPERN et GAUDIN (1948 et 1950), KOURILSKY et coll. (1948), MILTEIN (1955), MAHNERT (1957), ROTTER (1961).

Des propriétés similaires ont été découvertes chez des produits voisins, mais il ne semble pas qu'elles soient en relation directe avec l'existence de l'ensemble structural dithiole-thione (ENDERS 1953, ENDERS et DEEKERT 1953, KUHN et GISCHLER 1955, LUTTRINGHAUS et SCHMIDT 1955, 1958).

Plus récemment, la (méthoxyphényl)-5 dithiole-1,2 thione-3 a été reconnue active dans le traitement et la prévention de la sécheresse buccale consécutive à certaines thérapeutiques (LELORD et coll. 1969, DENIKER et coll. 1970, PAZAT 1971, BIRAGUE et coll. 1971).

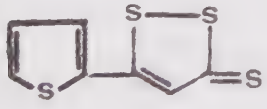
C H A P I T R E I I

MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES DIURETIQUES

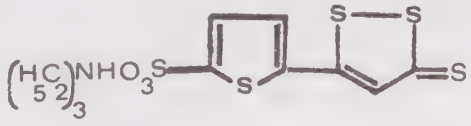
RECHERCHE D'UNE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE

Dans le but d'augmenter le pourcentage du soufre moléculaire et de conjuguer les actions pharmacologiques des dithiole-thiones et des composés thiophéniques, LOZAC'H et TESTE (1952) ont réalisé la synthèse de la (thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3 et de plusieurs de ses dérivés.

Par chlorosulfonylation de ce composé, puis action de la triéthylamine sur le chlorure de sulfonyle, TESTE et DORANGE (1966) ont préparé le (thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de triéthylammonium, que nous désignerons dans la suite de cet exposé par ses initiales T.S.T.. Ce produit, qui présente l'avantage d'être soluble dans l'eau, a été expérimenté chez le rat suivant les tests de "screening".



(thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3



(thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de triéthylammonium (T.S.T.)

Contrairement aux hypothèses, les premiers essais n'ont pas permis de mettre en évidence une action cholérétique par la méthode de la fistule biliaire temporaire chez le rat et chez le chien, mais ils ont mis en relief des propriétés diurétiques (BELAUD, DARTIGUES et coll. 1968).

I. ETUDE DES PROPRIETES DIURETIQUES DU T.S.T..

La découverte de propriétés diurétiques chez un composé de cette série, qui ne s'apparente chimiquement à aucun des diurétiques connus, nous a incité à rechercher en premier lieu une estimation quantitative des effets du T.S.T. sur les excrétions de l'eau et des électrolytes, dans le but de situer approximativement ce produit par rapport aux principales classes de diurétiques.

1. TECHNIQUES.

Nous avons choisi comme premier animal d'expérience le rat.

Parmi les nombreuses techniques d'usage courant proposées par les méthodologies (TURNER 1965, BURGER 1968) et les différents auteurs, nous avons choisi la méthode de LIPSCHITZ (1943) modifiée par HWANG (HWANG et coll. 1954, HWANG et GOLDBERG 1959) à laquelle nous avons apporté quelques aménagements.

L'expérimentation a été réalisée sur des rats blancs Wistar (*Rattus norvegicus* B.), de poids moyen 190 g. Les animaux, à jeun depuis 18 heures, sont répartis de manière aléatoire en six lots de trois : deux lots servent de témoins; les quatre autres reçoivent le produit à la dose de 25, 50, 100 et 200 mg/kg per os, en suspension dans 2 cm^3 de solution de gomme arabique à 10 % du fait de sa faible solubilité dans l'eau. Les animaux témoins reçoivent également per os 2 cm^3 de solution de gomme arabique. Un surcharge de solution de chlorure de sodium à 9 g/l est administrée à chaque rat, par voie intrapéritonéale, à raison de 2,5 cm^3/ 100 g.

Chaque lot est ensuite placé dans une cage à métabolisme et les urines sont recueillies pendant six heures sous huile de paraffine.

Les dosages du sodium et du potassium ont été réalisés par photométrie de flamme et celui du chlore par mercurimétrie en présence de diphénylcarbazone (SCHALES et SCHALES 1941).

Le taux des bicarbonates urinaires a été déterminé par gazométrie suivant la méthode manométrique de VAN SLYKE (DEVAUX 1970).

Les pH ont été mesurés électrométriquement.

Six expériences ont été réalisées dans ces conditions.

2. RESULTATS.

Nous avons choisi d'exprimer les résultats par les différences entre les quantités excrétées par les lots d'animaux traités et par les lots d'animaux témoins, pour 1 kg d'animal et pendant six heures. De nombreuses expériences d'études de diurèses sous l'effet de produits divers, sur des lots d'animaux différents et dans des conditions variables, nous ont permis de constater que ce mode d'expression fournissait les résultats les plus constants et par conséquent les plus comparatifs. Ce type d'estimation est couramment employé par plusieurs auteurs (FORD et coll. 1957, BARTORELLI et coll. 1959, PIAN et coll. 1960, FORD et BUSH 1960, FLUCKIGER et coll. 1963).

Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant (tableau II. 1.).

Tableau II. 1.

Effets du T.S.T. sur l'excrétion urinaire de l'eau et des ions sodium, potassium, chlore et bicarbonate chez le rat

Dose mg/kg	Augment. V urinaire en ml/kg/6 h	Augmentation de l'excrétion ionique en µEq/kg/6 h			
		Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-
25	5,0	225	300	265	2 NS
50	7,5	388	532	689	6 NS
100	8,9	389	669	1269	3 NS
200	10,8	1379	672	2199	3 NS

(NS : Différence non significative $P > 0,05$)

La méthode du "t" de STUDENT appliquée aux petits échantillons nous fait considérer comme non significatives (NS) les différences associées à une probabilité $P > 0,05$.

Les pH urinaires varient très peu; on peut cependant noter une tendance à l'acidification de l'urine chez les animaux auxquels le produit a été administré. A titre d'exemple, les pH des échantillons d'urine émis par les lots de trois rats au cours de la première expérience de la série ont présenté les valeurs suivantes :

Dose en mg/kg	0	0	25	25	50	50	100	100	200	200
pH	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	5,9	5,9	5,8	5,8	5,8

Des essais succints nous ont montré que le T.S.T. agissait chez le rat quel que soit le mode d'administration et qu'il était également actif chez le chien.

3. DISCUSSION.

Sous l'action du T.S.T. nous pouvons observer, à la suite de ces expériences chez le rat, une faible diminution du pH, une augmentation du volume urinaire, une augmentation des excrétions du sodium, du potassium et du chlore, sans variation de l'excrétion bicarbonatée. Il importe de noter que l'augmentation de l'excrétion du potassium est relativement faible en regard de celle de l'excrétion sodique.

Il est donc permis de penser (v. chap. I,p. 31) que le T.S.T. est un agent diurétique qui n'agit pas par inhibition de l'anhydrase carbonique, qui n'exerce aucune action antagoniste ou inhibitrice vis à vis de l'aldostérone et des minéral-corticoïdes et qui se différencie des organo-mercuriels et de l'acide éthacrynique par son action chez le rat après administration par voie digestive.

L'ensemble de ces caractères permet de considérer que le T.S.T. exerce une action du type saliurétique, comparable à première vue à celles qu'exercent le furosémide et les sulfamides saliurétiques s'apparentant au chlorothiazide.

II. RECHERCHE D'UNE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE.

Avant de préciser les modalités d'action de ce produit nouveau, nous avons voulu caractériser au niveau de sa structure moléculaire le ou les facteurs physico-chimiques responsables de cette activité saliurétique.

Nous avons pour cela étudié les effets sur la diurèse du rat de différents composés choisis en fonction du but recherché.

1. PRODUITS ESSAYES.

Deux groupes de dérivés de la dithiole-thione, dont les formules et les appellations sont figurées dans le tableau suivant (tableau II. 2.), ont été utilisés :

- treize composés non sulfamidés (1 - 13) n'ayant aucune parenté chimique avec les diurétiques connus (un seul parmi ceux-ci, la (méthoxy-4 phényl) -5 dithiole-1,2 thione-3, est employé en thérapeutique pour ses propriétés cholérétiques).

- quatre dérivés sulfamidés (14 - 17) auxquels la fonction sulfamide est susceptible de conférer certaines propriétés diurétiques, indépendamment de celles qui pourraient relever d'autres caractères physiques ou chimiques.

En ce qui concerne les dérivés 1, 2, 5, 6, 7, 10, 15 et 17, la partie expérimentale et les caractéristiques chimiques et physiques des sulfamides, des sulfonates de triéthylammonium et de sodium dérivés des aryl-5 ou thiényl-5 dithiole-1,2 thiones-3 ou -ones-3 chlorosulfonylées seront décrites ultérieurement (DORANGE 1975).

Parallèlement, sept composés connus (a, b, c, d, e, f, g), étrangers à cette série, ont été essayés dans les mêmes conditions expérimentales pour servir de termes de référence.

Les essais des produits 1, 2, 3, 4, 6 et a ont fait l'objet d'une communication préliminaire (DARTIGUES et coll. 1969).

Les comparaisons ont porté sur les excrétions urinaires en 6 heures de l'eau, du sodium, du chlore, et dans certains cas du bicarbonate et du produit administré.

2. TECHNIQUES.

L'expérimentation a été réalisée sur le rat, suivant le protocole précédemment décrit, avec des doses de 50 et 200 mg/kg.

Pour chaque produit essayé, les expériences ont été répétées en nombre suffisant pour pouvoir estimer la signification des différences observées ($P < 0,05$ pour les différences significatives).

Chaque fois que la mesure électrométrique du pH urinaire a fait apparaître une variation sous l'effet d'un produit, le bicarbonate a été dosé par gazométrie.

Lorsque cela était possible, les produits essayés on été dosés dans l'urine après vérification de leur identité par spectrographie ou par chromatographie.

Aucune méthode de dosage des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 n'étant décrite dans la littérature, nous avons du en établir une qui permettrait leur dosage urinaire.

- Méthode de dosage des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3.

Deux possibilités s'offraient à nous en première analyse, soit le dosage spectrophotométrique direct à partir de la coloration propre de ces produits, soit le dosage spectrophotométrique à partir de la coloration fournie par la réaction particulière à la fonction thione décrite par GROTE (1931).

a) Dosage spectrophotométrique direct.

Pour faire choix d'une longueur d'onde en vue du dosage, nous avons déterminé les spectres d'absorption en milieu aqueux ou alcoolique par spectrophotométrie différentielle.

Les composés thioniques colorés présentent deux bandes d'absorption dans l'U.V. entre 230 et 280 nm et entre 320 et 360 nm, et une bande dans le visible entre 410 et 460 nm. Les composés oniques n'absorbent pratiquement pas dans le visible. Ces résultats s'accordent avec ceux qui ont été rapportés dans la littérature pour des produits différents appartenant à la même série (BRESLOW et SKOLNIK 1966).

Les spectres d'absorption du T.S.T. et de son homologue onique en solution aqueuse sont représentés ci dessous (figure II. 1.).

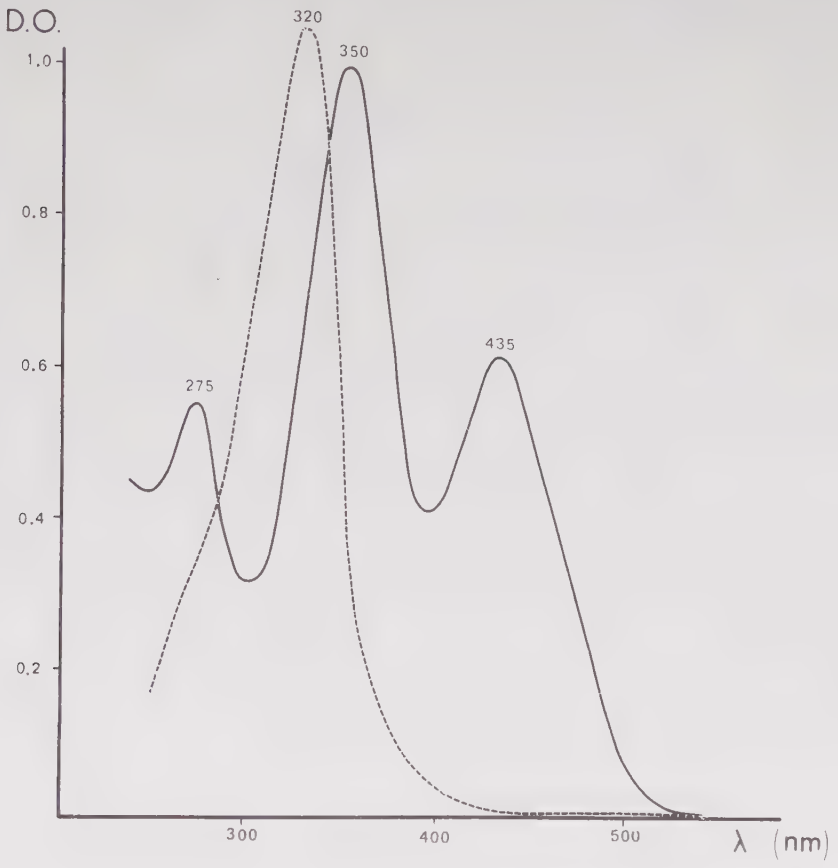


Fig. II. 1. - *Spectres d'absorption du T.S.T. (——) et de son homologue onique (---) en solution aqueuse à 20 mg/ℓ.*

Les spectres sont pratiquement identiques dans tous les solvants utilisés (éthanol, eau, soluté de NaCl à 9 g/1, urine).

Chaque échantillon d'urine ne pouvant avoir son propre"blanc", nous avons du rechercher une longueur d'onde telle que l'absorption de l'urine soit minime en comparaison de celle du produit.

Le spectre d'absorption de l'urine pure par rapport à l'eau est représenté ci dessous (figure II. 2.).

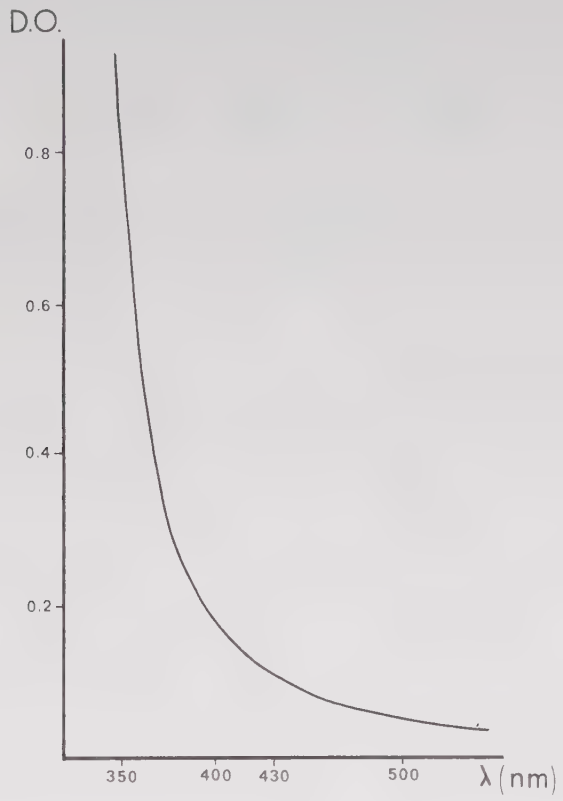


Fig. II. 2. - *Spectre d'absorption de l'urine de rat par rapport à l'eau.*

Le spectre d'absorption par rapport au soluté de NaCl à 9 g/l est pratiquement identique.

Ces observations nous ont conduit à choisir les longueurs d'onde de 430 nm pour les dérivés thioniques et de 320 nm pour les dérivés oniques.

Nous pratiquons les dosages des produits sur des dilutions d'urine au 1/100e dans l'eau distillée, en prenant comme "blanc" une même dilution de l'urine des animaux témoins. Cette technique permet de réduire au maximum l'influence de l'absorption propre de l'urine.

Pour le T.S.T. comme pour les autres composés étudiés, la loi de BEER-LAMBERT ne peut s'appliquer rigoureusement que pour des concentrations inférieures à 0,02 mg/ml (figure II. 3.), pour la longueur d'onde choisie.

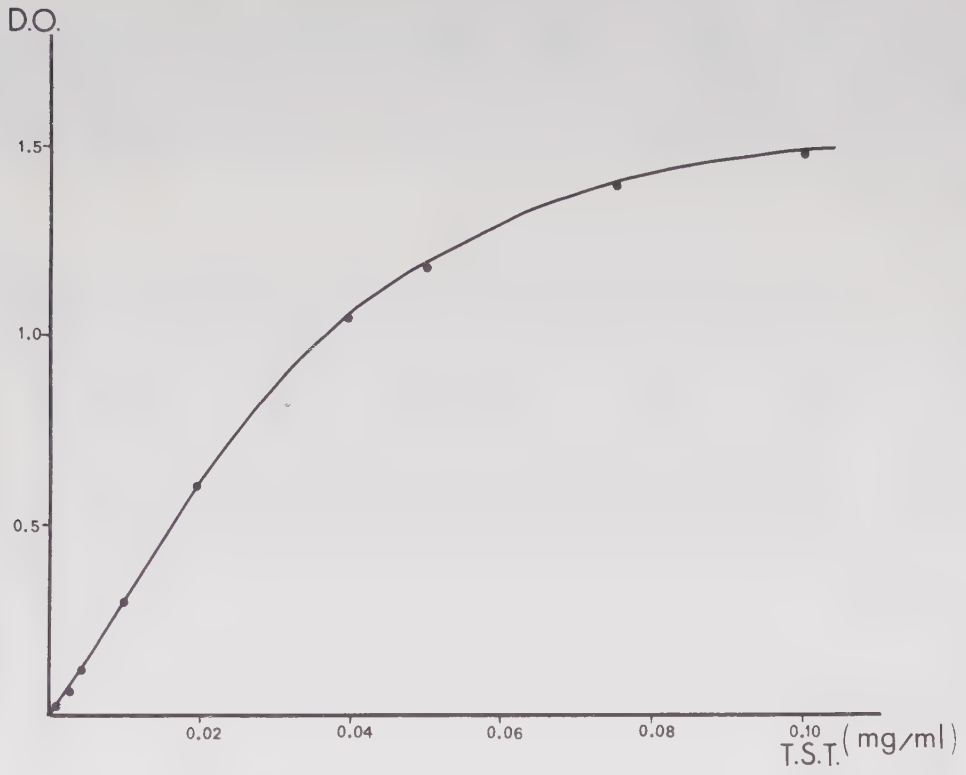


Fig. II. 3. - *Dosage spectrophotométrique direct du T.S.T. en solution aqueuse à 430 nm.*

Dans l'urine les dosages se pratiquent sur des dilutions au 1/100e en prenant comme blanc une même dilution de l'urine des animaux témoins.

b) Dosage spectrophotométrique après action du réactif de GROTE.

Le réactif de GROTE au pentacyanaquoferrate trisodique $[Fe(CN)_5H_2O]\ Na_3$ s'obtient à partir du mélange des produits suivants :

Nitroprussiate de sodium	0,5	g
Eau distillée	10	ml
Chlorhydrate d'hydroxylamine	0,5	g
Bicarbonate de sodium	1	g

Quand le dégagement gazeux a cessé, on ajoute II gouttes de brome et on élimine l'excès par aération. La solution, de couleur verdâtre, est ensuite complétée à 25 ml avec de l'eau distillée. Ce réactif se conserve mal.

Le réactif de GROTE donne en présence de la fonction thione des colorations allant du bleu au vert foncé. Les dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 produisent dans ces conditions une coloration verte.

La réaction se pratique en ajoutant 1 ml de réactif de GROTE à 10 ml de solution aqueuse du produit. La lecture est faite après 20 minutes de repos à l'obscurité.

Le spectre d'absorption du T.S.T. après action du réactif de GROTE est représenté ci-dessous (figure II. 4.).

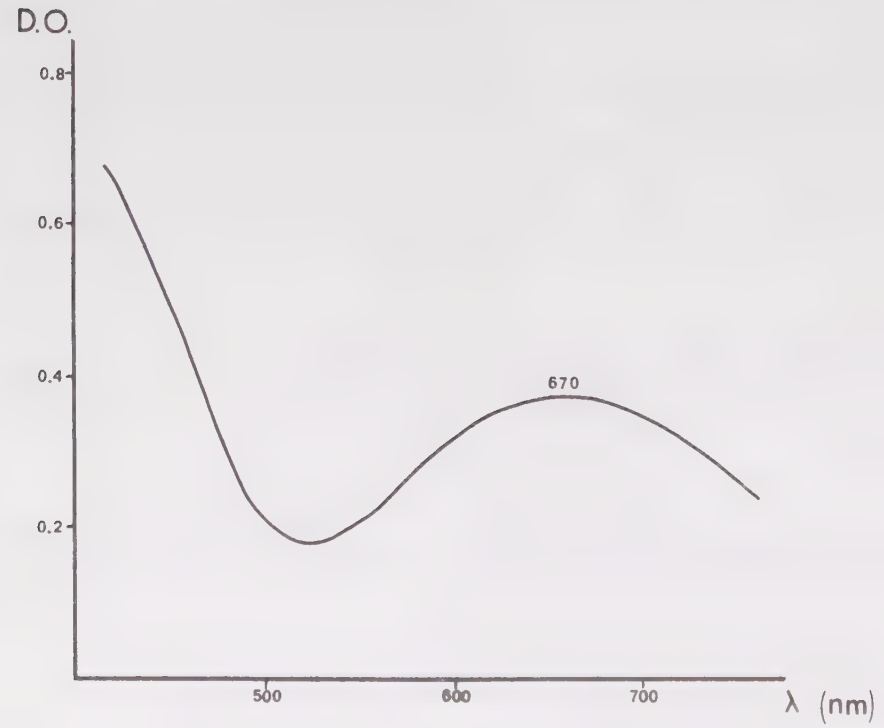


Fig. II. 4.:- *Spectre d'absorption du T.S.T. en solution aqueuse à 0,02 mg/ml, après action du réactif de GROTE. (10 ml de solution de T.S.T. + 1 ml de réactif)*

Tous les composés étudiés présentent, comme le T.S.T., une bande d'absorption vers 670 nm. C'est la longueur d'onde que nous avons choisie pour les dosages.

La loi de BEER-LAMBERT s'applique, à la longueur d'onde considérée, pour des concentrations inférieures à 0,05 mg/ml, aussi bien dans le cas du T.S.T que dans celui des autres composés de la série (figure II. 5.).

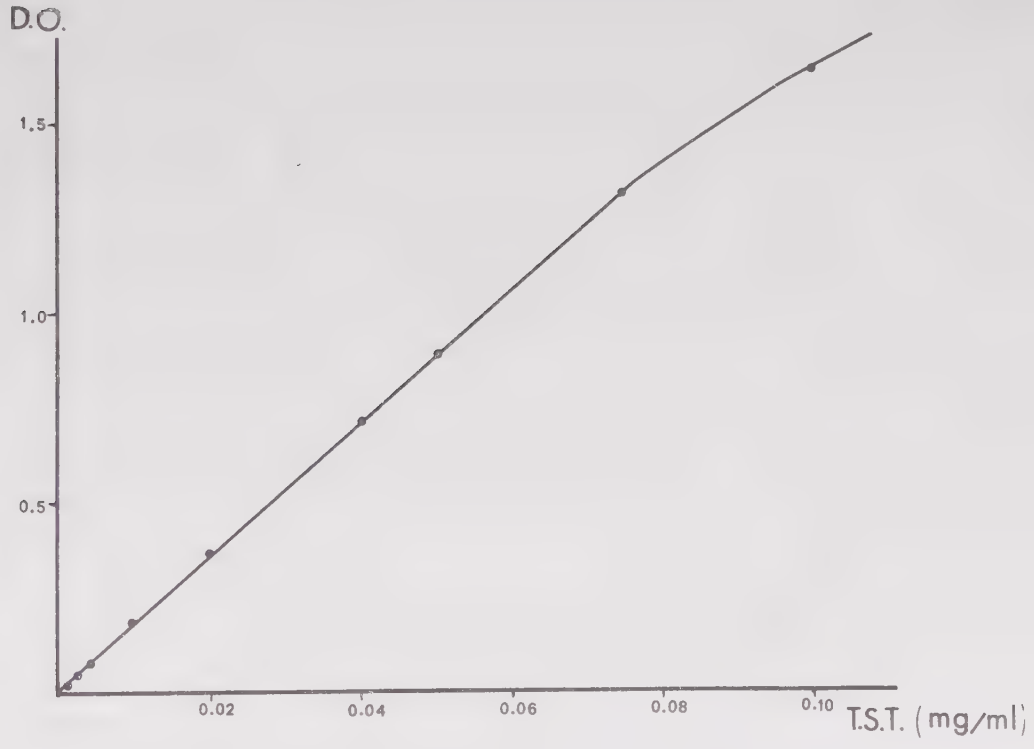


Fig. II. 5. - *Dosage spectrophotométrique du T.S.T. en solution aqueuse, après action du réactif de GROTE, à 670 nm.*
(10 ml de solution de T.S.T. + 1 ml de réactif)

Dans l'urine les dosages se pratiquent sur 10 ml d'une dilution au 1/100e auxquels on ajoute 1 ml de réactif de GROTE. (Cette méthode ne peut évidemment s'employer avec les dérivés cétoniques.)

Les densités optiques sont lues après vingt minutes de repos à l'obscurité. L'urine diluée des animaux témoins sert de blanc.

c) Corrélation entre les résultats fournis par les deux méthodes.

Nous avons pu observer une excellente corrélation entre les résultats fournis par les deux types de méthodes, comme l'indique la figure suivante (figure II. 6.).

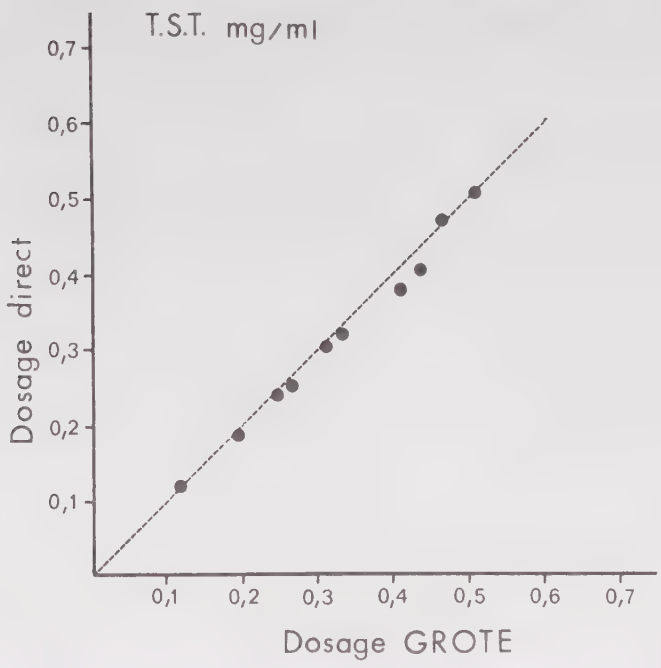


Fig. II. 6. - *Corrélation entre les résultats du dosage du T.S.T dans l'urine, obtenus d'une part par dosage spectrophotométrique direct et d'autre part par dosage spectrophotométrique après action du réactif de GROTE.*

Après avoir apprécié, au cours des premiers essais, l'excellente corrélation entre les deux séries de résultats, nous avons poursuivi cette étude en recourant au dosage spectrophotométrique direct.

3. RESULTATS.

Les résultats sont exprimés, comme dans les expériences précédentes, par les augmentations des volumes urinaires en ml et des excrétions des ions sodium, chlore et bicarbonate, en micro-équivalents, par kg d'animal et pendant six heures.

Dans certains cas, le pourcentage d'élimination urinaire en six heures de la dose administrée a pu être calculé.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant (tableau II. 3.).

4. DISCUSSION.

L'examen des résultats montre que certains des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 exercent une action diurétique de type et d'intensité variables.

Ils peuvent approximativement se classer dans l'ordre suivant des activités décroissantes :

- Dérivés non sulfamidés : 2, 1, 13, 5, 11, 7, 10, 8, 4
- Dérivés sulfamidés : 15, 14, 16,

Les produits 3, 9, 12 et 17 paraissent dépourvus de toute activité diurétique.

Ces constatations appellent les remarques suivantes :

1) Dérivés non sulfamidés.

Tous les dérivés non sulfamidés actifs exercent des effets de type saliurétique, l'augmentation de l'élimination du chlore étant parallèle à celle du sodium et s'opérant sans augmentation de l'excrétion bicarbonatée.

Tableau II. 2.

Produits essayés

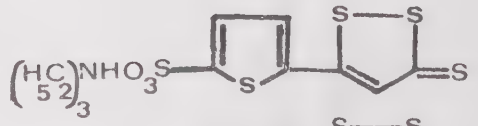
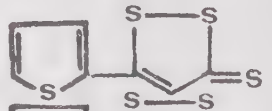
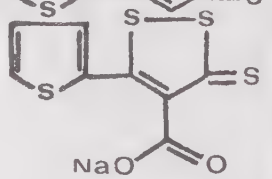
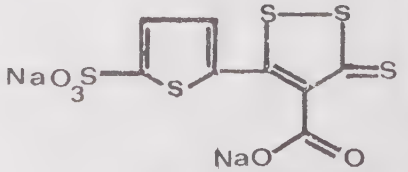
N° code	Référence	Formule	Nomenclature	Solubilité dans l'eau
			A) Dérivés de la dithiole -1,2 thione-3 a) non sulfamidés	
1	TESTE et DORANGE (1966) DORANGE (1975)		(Thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de triéthylammonium	$0,8^{+}$ g/l
2	DORANGE (1975)		(Thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de sodium	$1,8^{++}$ g/l
3	LOZAC'H et TESTE (1952)		(Thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3	0
4	TREBAUL (1970)		(Thiényl-2)-5 thioxo-3 dithiole-1,2 carboxylate-4 de sodium	+
5	DORANGE (1975)		(Sulfonato-5 thiényl-2)-5 thioxo-3 dithiole-1,2 carboxylate-4 disodique	++++
6	DORANGE (1975)		(Oxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de triéthylammonium	++
7	DORANGE (1975)		(Oxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de sodium	++
8	LABORATOIRES LATEMA (travail non publié)	Réf. Latéma 1191 L.	Dérivé soluble sulfoné de la méthoxy-4 phényl-5 dithiole-1,2 thione-3	+++ 5,6 g/l

Tableau II. 2. (suite)

Produits essayés

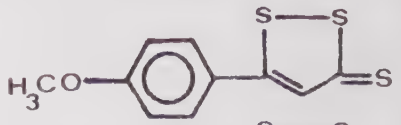
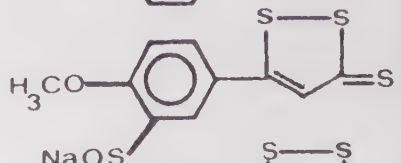
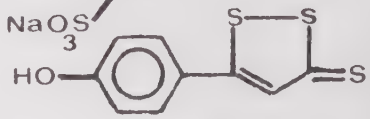
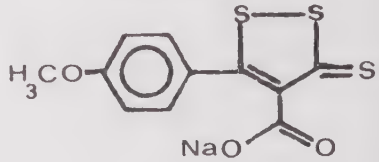
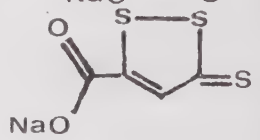
N° code	Référence	Formule	Nomenclature	Solubilité dans l'eau
9	CAUDIN et LOZAC'H (1947) BOTTCHER et LUTTRINGHAUS (1947)		(Méthoxy-4 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3	0
10	DORANGE (1975)		Méthoxy-2 (thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 benzène sulfonate de sodium	+++ 9 g/ l
11	BOTTCHER et BAUER (1951)		(Hydroxy-4 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3	+
12	TREBALL (1960)		(Méthoxy-4 phényl)-5 thioxo-3 dithiole-1,2 carboxylate-4 de sodium	+
13	KLINGSBERG (1960)		Thioxo-3 dithiole-1,2 carboxylate-5 de sodium	+
			b) sulfamidés	
14	TESTE et ANTOINE (1964)		(Sulfamoyl-5 thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3	0
15	DORANGE (1975)		(Sulfamoyl-5 thiényl-2)-5 dithiole-1,2 one-3	0
16	ANTOINE et TESTE (travail non publié)		(Chloro-5 sulfamoyl-4 thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3	0

Tableau II. 2. (fin)

Produits essayés

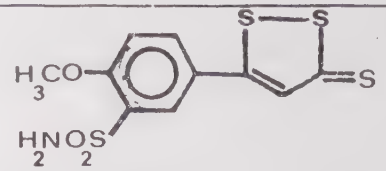
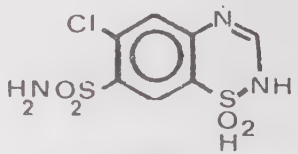
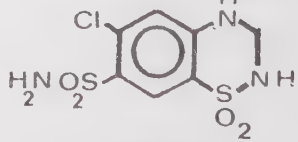
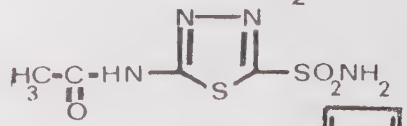
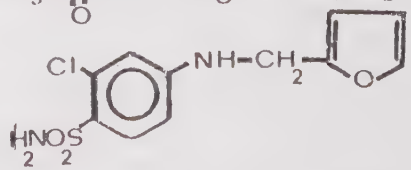
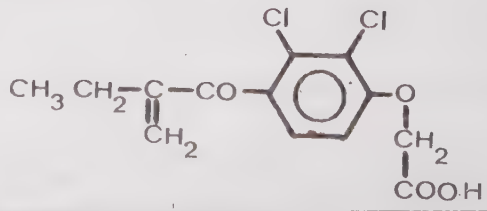
N° code	Référence	Formule	Nomenclature	Solubilité dans l'eau
17	DORANGE (1975)		(Méthoxy-4 sulfamoyl-3 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3	0
			B) Produits de référence	
a	HARTOUGH (1952)		Thiophène-2 sulfonate de sodium	+++
b	BUZAS et TESTE (1960)		Thiophène-2 sulfonamide	
c	NOVELLO et SPRAGUE (1957)		Chloro-6 sulfamoyl-7 benzothiadiazine 1, 2, 4, dioxyde -1,1 (Chlorothiazide)	
d	de STEVENS et coll. (1958)		Chloro-6 sulfamoyl-7 dihydro-3,4 benzothiadiazine -1,2,4 dioxyde -1,1 (Hydrochlorothiazide)	
e	ROBLIN et CLAPP (1950)		Acétylamino-2 sulfomoyl-5 -1, 3, 4 thiadiazole (Acétazolamide)	
f	STURM et coll. (1966)		Acide chloro-4 -N(-2 furyl-méthyl)-5 sulfamoyl anthranilique (Furosémide)	
g	SCHULTZ et coll. (1962)		Acide éthacrynique	

Tableau II. 3.

Effets sur la diurèse du rat des produits essayés (voie orale)

N° code	Dose 50 mg/kg					Dose 200 mg/kg				
	Augm.V ml/kg /6h	Augm. élim. ionique µEq/kg/6h			% él. en 6h	Augm.V ml/kg /6h	Augm. élim. ionique µEq/kg/6h			% él. en 6h
		Na^+	Cl^-	HCO_3^-			Na^+	Cl^-	HCO_3^-	
1	7,5	388	689	3★	8	10,8	1379	2199	3★	8
2	11,2	2502	2448	6★	14	49,9	5229	7360	11★	12
3	0,6★	10★	6★	0	0	2,8★	20★	16★	0	0
4	1,8	83	113	-	80	5,8	264	259	-	70
5★★	2,5	631	563	-	85	7,5	1269	1090	-	76
6	0,9★	21	11	-	50	0,6★	56	43	-	45
7	2,8	263	254	-	70	3,3	876	871	-	67
8	0,9★	156	140	-	6	3,2	299	317	-	2
9	1,5★	-20★	-10★	0	0	1,8★	-21★	-8★	0	0
10	1,0★	246	394	-	6	5,5	349	558	-	2
11	6,7	472	536	-	22	12,3	695	763	-	24
12★★	-0,1	-37	-30	0	-	-0,2	-35	-10	0	-
13★★	7,3	364	435	-	44	8,9	1638	1450	-	35
14	4,0	570	405	145	5	7,0	1016	439	523	3
15	7,8	1485	205	1417	-	13,2	2515	283	2390	-
16	0,1★	279	275	0	traces	0,1★	429	450	0	tr.
17★★	-1,3	-56	-42	-	0	0,1	2	32	-	0
a	-0,4★	183	106	0	-	-2,3★	153	99	0	-
b	9,5	1585	430	1397	-	17,4	3375	549	3558	-
c	6,3	1534	1381	232	-	8,5	1741	1558	440	-
d	9,4	1701	2031	-	-	31,7	4610	5320	-	-
e	15,5	3423	-44	3383	-	23,0	4017	-240	4675	
f	65,9	7151	8837	-	-	80,0	9100	10500	-	-
g★★	-7,5	-307	-520	-	-	-7,5	-408	-640	-	-

★ Différence non significative ($P > 0,05$)

★★ Moyenne obtenue à partir de deux expériences seulement

Les composés actifs sont tous hydrosolubles et susceptibles de s'éliminer par le rein. Les dérivés 3 et 9, insolubles dans l'eau et non excrétés par le rein, sont dépourvus d'activité.

Il convient de noter que 9 est insoluble et inactif, tandis que 11, qui est son homologue déméthylé, est hydrosoluble, actif et présent dans l'urine.

L'hydrosolubilité et la possibilité d'excrétion rénale constituent donc d'importants facteurs d'activité.

Le composé 2, qui s'est révélé le plus actif, ne doit rien de son activité au groupement thiophène-2 sulfonate de sodium qui se trouve dans sa molécule puisque a est pratiquement dépourvu d'activité diurétique. L'action pharmacologique paraît donc relever principalement du groupement dithiole-thione.

L'intensité des effets d'un produit de cette série n'est pas en relation avec l'importance de son excrétion rénale. Les composés 4, 5, 6 et 7, dont les taux d'élimination sont élevés, sont cependant peu actifs.

Les composés solubles 4, 5 et 12 sont porteurs d'un groupement $-COO^-$ en 4 placé en ortho par rapport à la fonction thione. 4 est peu actif. 5 est beaucoup moins actif que 2 dont il ne diffère que par la fonction $-COO^-$. 12 est totalement inactif. Il est permis de penser que, dans ces composés, la fonction carboxyle en 4 exercerait une certaine action inhibitrice sur la réactivité de la fonction thione. Cette hypothèse se fonde sur l'étude de certains composés de ce type qui semble indiquer que la fonction thione se trouve chélatée en milieu organique par l'hydroxyle du groupement -COOH (TREBAUL 1970). Dans cette hypothèse, l'activité comparativement faible de 4, 5 et 12 serait en rapport avec une faible réactivité de la fonction thione.

La substitution du soufre thionique par l'oxygène dans 1 et 2, qui conduit à 6 et 7, diminue considérablement l'activité saliurétique, sans modifier notablement l'hydrosolubilité. Notons que l'élimination de 6 et 7 est beaucoup plus importante que celle de 1 et 2.

Ces considérations appellent l'attention sur l'importance du rôle de la fonction thione dont la suppression ou l'inactivation diminuent ou inhibent l'activité diurétique.

Le composé 13, dans lequel le groupement hydrophile -COOH est directement fixé sur le cycle dithiole-thione, exerce une action qui paraît se différencier de celle des autres composés actifs de la série. Cette action est plus étalée dans le temps et semble, aux doses élevées, favoriser principalement l'excrétion du sodium.

2) Dérivés sulfamidés.

A l'exception de 17 qui ne s'excrète pas par le rein, les produits sulfamidés thioniques ou oniques sont actifs.

Selon les théories de CRAWFORD et coll. (1960), les composés sulfamidés cycliques peuvent exercer une certaine activité diurétique, soit par inhibition de l'anhydrase carbonique lorsque le cycle ne porte aucun substituant en ortho par rapport au groupement $-SO_2NH_2$ (ce qui est le cas pour les produits de référence b et e), soit par un autre mécanisme plus complexe dans le cas contraire (ce qui est le cas pour c et d).

L'action des dérivés de la dithiole-thione parait s'exercer suivant ce schéma puisque 14 et 15 se révèlent inhibiteurs de l'anhydrase carbonique en augmentant le pH urinaire et l'excrétion bicarbonatée.

Le composé 14 est moins actif que 15 mais son caractère saliurétique est plus marqué comme l'indiquent les rapports des excrétions $\frac{HCO_3}{Cl^-}$ qui ont pour valeurs 0,3 - 1,2 dans le cas de 14 et 7,2 - 8,4 dans le cas de 15.

Il convient de noter que 15 exerce sensiblement les mêmes effets que b, ce qui semble indiquer que l'ensemble thiophène-2 sulfonamide représente pratiquement le seul groupement actif de 15.

La présence de la fonction thione paraît donc accentuer, tout au moins qualitativement, le caractère saliurétique.

Dans tous les cas, les dérivés thiophéniques paraissent plus actifs que les dérivés benzéniques.

Les activités des composés 2 et 7 ont été également étudiées chez le chien. Les résultats, qui confirment les observations faites chez le rat, seront indiqués au chapitre suivant.

La comparaison des effets des dérivés de la dithiole-thione avec ceux des produits de référence a, b, c, d, e, f, g montre que le composé 2, le plus actif, exerce chez le rat des effets saliurétiques quantitativement intermédiaires entre ceux du chlorothiazide c et du furosémide f.

Aucun des produits essayés ne s'est révélé toxique chez le rat aux doses employées.

Remarque : Cette étude n'a pas été étendue aux dérivés mercuriels qui sont inactifs et toxiques chez le rat.

III. CONCLUSIONS.

Certains dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 possèdent des propriétés diurétiques du type saliurétique.

Leur action paraît conditionnée par :

- la présence dans la molécule d'un groupement chimique susceptible d'assurer l'hydrosolubilité du produit, son assimilation par l'organisme et son excrétion au niveau du néphron. Ce groupement doit être fixé sur le cycle dithiole-thione, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un cycle, de préférence thiophénique; il ne doit pas diminuer la réactivité de la fonction thione.

- l'existence d'une fonction thione réactive.

Puisqu'aucun des autres composés thioniques étrangers à la série étudiée, dans lesquels la fonction thione ne présente qu'une faible réactivité, ne possède de propriétés diurétiques, il est permis de penser que l'activité saliurétique des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 résulte en grande partie du caractère particulier que présente la fonction thione dans l'ensemble dithiole-1,2 thione-3 (DORANGE et coll. 1973).

Parmi les produits étudiés, le plus actif est le (thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de sodium. En outre, l'action exercée par ce composé ne peut être imputée qu'au groupement dithiole-thione

Pour ces deux raisons nous pouvons considérer ce produit comme l'élément le plus représentatif de cette nouvelle classe de diurétiques et en faire choix pour étudier les modalités de leur action.

Dans la suite de notre exposé nous désignerons le thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de sodium par ses initiales T.S.S..

T.S.S.

C H A P I T R E I I I

EFFETS DU T.S.S. CHEZ L'ANIMAL

Comme il a été indiqué dans le chapitre précédent, c'est au moyen du T.S.S. que va être poursuivie l'étude des modalités d'action des diurétiques dérivés de la dithiole-1,2 thione-3.

Ce composé est par ailleurs assez soluble dans l'eau, ce qui en facilite l'emploi.

I. BILANS D'EXCRETION CHEZ LE RAT ET CHEZ LE CHIEN.

Cette étude se propose de définir les effets du T.S.S. dans le but d'effectuer des comparaisons, de situer le produit par rapport aux principales classes de diurétiques et d'établir une première hypothèse sur son mécanisme d'action.

1. TECHNIQUES.

A. Expérimentation chez le rat.

Les expériences ont été réalisées dans les conditions décrites au Chapitre II.

Lorsque le produit est administré par voie intrapéritonéale, il est mis en solution dans la surcharge de sérum physiologique.

Les expériences ont été répétées en nombre suffisant pour éliminer les facteurs de variation et pour pouvoir estimer la signification des différences observées.

B. Expérimentation chez le chien.

Les expériences ont été réalisées sur des chiens à jeun depuis 24 heures, anesthésiés par injection intraveineuse de chloralose à la dose de 100 mg/kg et soumis à la respiration artificielle.

L'urine est recueillie par cathétérisation des uretères à l'aide de tubes de polyéthylène. Des canules sont mises en place au niveau de la veine saphène droite pour la perfusion des différents solutés ainsi qu'au niveau d'une branche de la veine fémorale gauche pour les prises de sang.

Les chiens sont perfusés pendant toute la durée de l'essai, à la vitesse de 3,75 ml/minute, avec une solution de chlorure de sodium à 9 g/l contenant de l'inuline (3 g/l), de l'acide para-amino-hippurique (0,4 g/l) pour la mesure des clearances correspondantes, et du nembutal (5 mg/kg/heure) pour entretenir l'anesthésie.

Après une heure environ de perfusion, la diurèse devient stable. Les urines sont alors collectées toutes les vingt minutes et les prélèvements de sang sont faits au milieu de chaque période de vingt minutes.

Lorsque trois contrôles consécutifs ont permis de constater une diurèse régulière, le produit est administré en solution dans le perfusat pendant une heure.

Au cours de l'heure suivante, la perfusion est poursuivie avec le soluté dépourvu de substance active.

Chaque expérience se déroule ainsi en trois phases d'une heure :

- une phase de contrôle permettant de s'assurer de la régularité de la diurèse de base et de l'évaluer,

- une phase d'administration du produit dans le liquide de perfusion et d'étude de l'action diurétique,
- une phase d'étude de l'évolution de la diurèse après arrêt de l'administration du produit.

Ce protocole est calqué sur différentes techniques décrites par de nombreux auteurs (FORD et coll. 1957, RUSSO et coll. 1957, BEYER 1958, CIER 1959, LIGOU et NAHAS 1959, PULVER et coll. 1959, STENGER et WIRZ 1960, MUSCHAWECK et HADJU 1964, BOISSIER et coll. 1967, SMALL et CAFRUNY 1967).

Six expériences ont été réalisées dans ces conditions. Au cours de deux d'entre elles, l'électrocardiogramme en dérivation D II et la pression artérielle ont été enregistrés. Dans deux autres expériences les animaux n'ont pas été perfusés et le produit leur a été administré en totalité à la fin de la phase de contrôle.

C. Méthodes chimiques.

Les dosages du sodium, du potassium, du chlore, du bicarbonate, les déterminations des pH ont été réalisés suivant les méthodes déjà signalées.

Le calcium a été dosé par complexométrie suivant la méthode de TRONCHET (1958).

L'acidité de titration a été dosée par alcalimétrie en présence de phénolphtaléine. L'ammoniurie globale (azote amino-ammoniacal) a été déterminée par formoltitration suivant la méthode de RONCHESE. Ces deux dosages ont permis de calculer l'Equivalence Acide Totale des urines (E.A.T.) (LECOQ 1967).

Le dosage du phosphore s'est effectué par colorimétrie au moyen du réactif sulfomolybdique selon la technique de BRIGGS (DEVAUX 1970).

L'acide urique a été dosé par colorimétrie à partir de la réaction à l'acide phosphotungstique suivant la méthode de VALETTE et coll. (1958).

Les dosages de l'inuline et de l'acide para-amino-hippurique (P.A.H.) ont été pratiqués par voie automatique selon les techniques décrites par GALLI et JEANMAIRE (1965) et ARDAILLOU (1964).

L'urée sanguine ainsi que la glycémie ont été également déterminées au moyen de l'Autoanalyseur suivant les méthodes de HOFFMAN et de SKEGGS qui sont décrites dans le formulaire TECHNICON (1963).

Pour tous les dosages, nous avons cherché à éliminer les possibilités d'interférence du T.S.S. qui se retrouve dans le sang et dans l'urine.

2. RESULTATS.

Certains points de cette étude ont fait l'objet d'une communication préliminaire (DARTIGUES, ROQUEBERT et coll. 1972 a).

A. Chez le rat.

a) Effets en fonction de la dose et du mode d'administration :

Les résultats relatifs aux éliminations de l'eau, du sodium, du potassium, du bicarbonate, et les rapports Na/K sont rapportés dans le tableau suivant (tableau III.1.).

Nous constatons dans tous les cas une augmentation du volume d'urine excrété. L'effet est plus marqué lors de l'administration par voie intrapéritonéale pour les doses inférieures ou égales à 100 mg/kg. Pour des doses de l'ordre de 200 mg/kg l'effet est pratiquement identique quelle que soit la voie d'administration.

Des observations identiques peuvent être faites en ce qui concerne les éliminations du chlore et du sodium qui sont fortement accrues.

Tableau III. 1.

Effets du T.S.S. chez le rat après administration par voie orale (O) et par voie intrapéritonéale (IP)

(Moyenne de six expériences)

Dose mg/kg	Volume urinaire en ml/kg/6h		Elimination ionique en µEq/kg/6 heures								Rapport $\frac{Na}{K}$	
			Na^+		K^+		Cl^-		HCO_3^-			
	O	IP	O	IP	O	IP	O	IP	O	IP	O	IP
0	16,0 ± 2,4*	20,8 ± 3,5	1728 ± 277	2128 ± 303	1877 ± 102	1719 ± 262	2659 ± 330	2868 ± 267	23**	31,3**	0,92	1,23
25	23,3 ± 3,5	27,5 ± 4,0	3009 ± 638	3720 ± 461	2232 ± 178	3068 ± 364	3671 ± 607	5420 ± 203	18	39,8	1,35	1,21
50	27,2 ± 3,7	44,6 ± 4,9	4230 ±1336	5352 ± 685	2473 ± 113	3129 ± 303	5107 ±1259	7260 ± 488	29	34,4	1,71	1,70
100	29,4 ± 5,9	71,0 ± 3,7	4440 ± 688	8896 ± 710	2405 ± 265	4032 ± 385	5492 ± 990	11074 ± 492	26	53,3	1,85	2,07
200	65,9 ± 5,9	62,9 ± 4,9	6957 ± 443	7434 ± 429	3830 ± 210	4239 ± 208	10019 ± 853	10368 ± 953	34	48,0	1,82	1,75

(*) Ecart type de la moyenne

(**) Moyenne obtenue à partir de deux expériences seulement

L'excrétion du potassium n'est que faiblement augmentée et l'évolution du rapport Na/K reste toujours très favorable.

L'élimination du bicarbonate ne paraît guère affectée par le produit et reste peu importante.

Pour une même dose, les différences d'effet suivant le mode d'administration semblent dues aux conditions d'absorption du T.S.S. car elles disparaissent pratiquement lorsque les doses sont suffisamment élevées.

Lorsque le produit est administré par voie intrapéritonéale, les effets sont sensiblement proportionnels aux doses administrées, pour les doses de 25, 50 et 100 mg/kg (figure III. 1.).

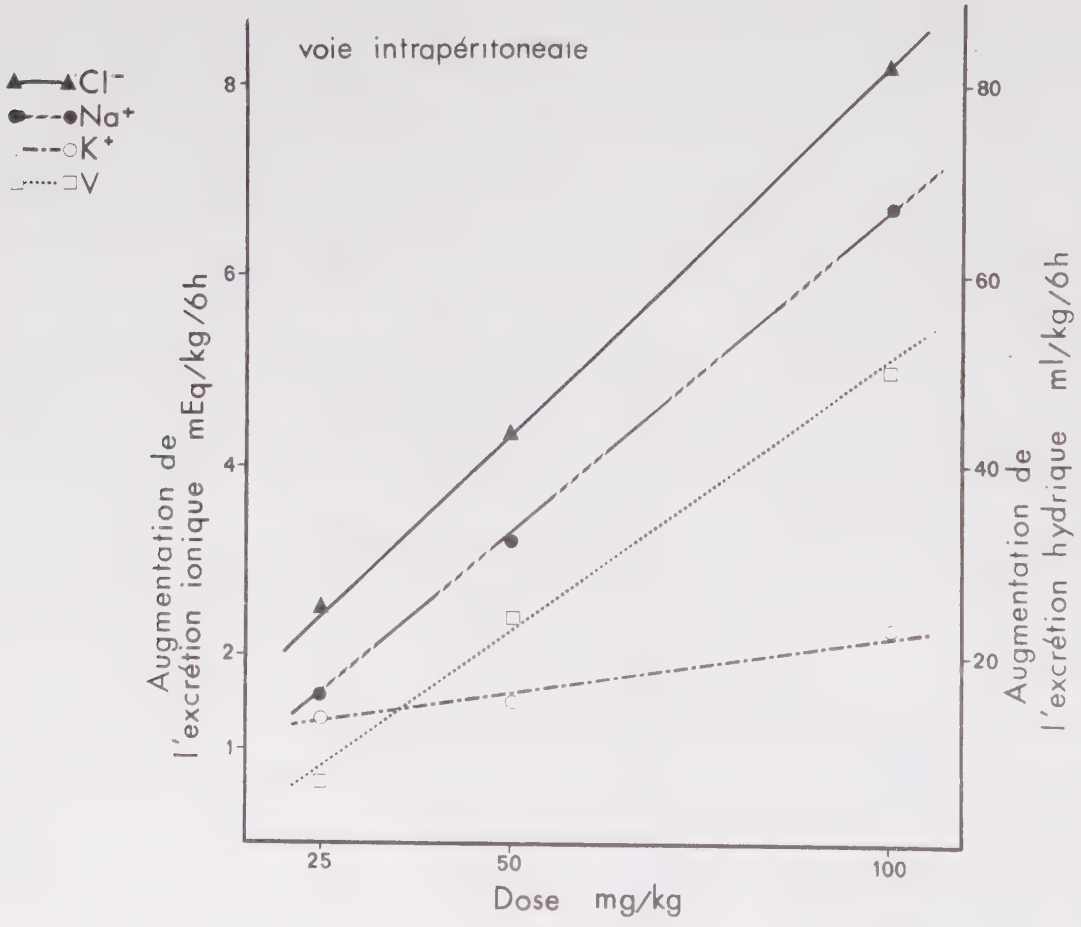


Fig. III. 1. - *Traduction graphique des effets en fonction des doses.*

b) Effets en fonction du temps et du mode d'administration pour une dose de 100 mg/kg :

Nous rapportons ici les effets observés après administration du T.S.S. par voie orale et par voie intrapéritonéale.

Les résultats, exprimant les quantités éliminées pendant chaque heure durant six heures, par un seul lot pour chaque expérience, sont figurés ci-dessous (figures III. 2. et III. 3.).

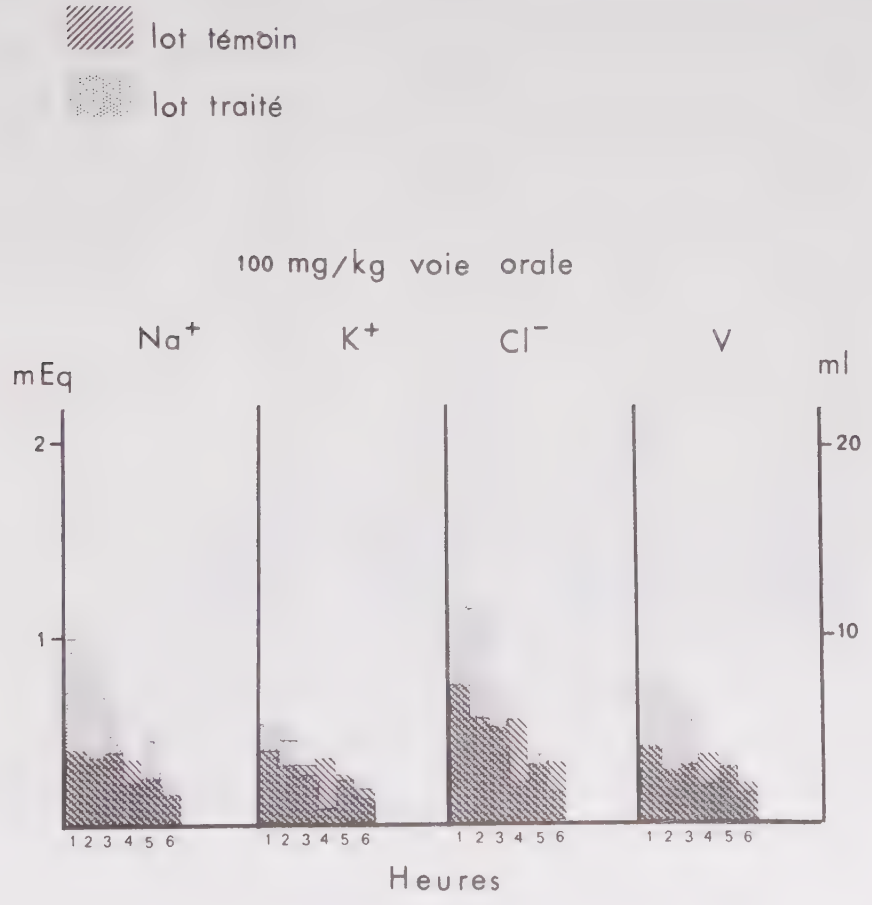


Fig. III. 2. - *Cinétique de l'excrétion des ions et de l'eau après administration du T.S.S. par voie orale.*

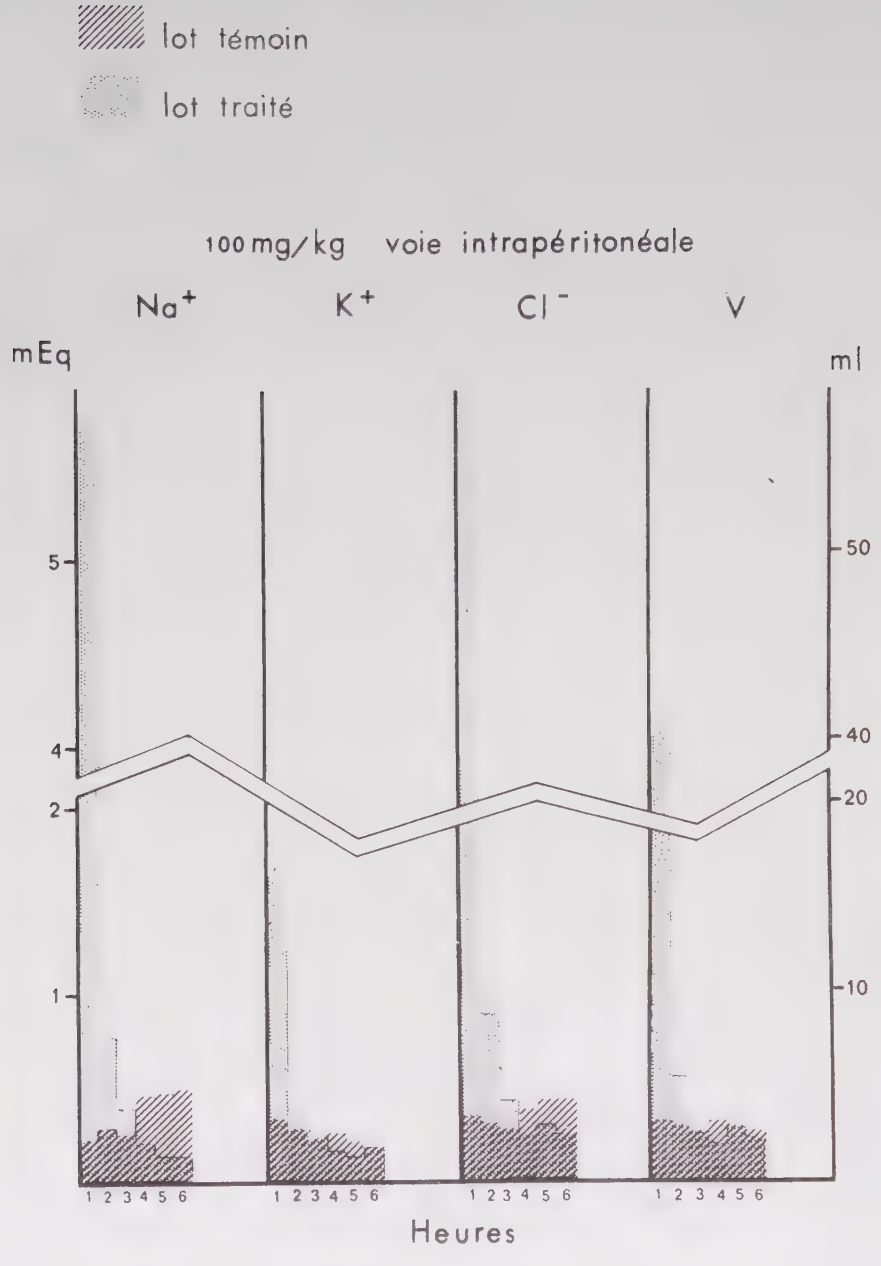


Fig. III. 3. - *Cinétique de l'excrétion des ions et de l'eau après administration du T.S.S. par voie intrapéritonéale.*

Avec une dose active de 100 mg/kg, l'effet maximum se manifeste au cours de la première heure, puis décroît progressivement. Cette action se produit pour tous les paramètres enregistrés, volume et éliminations du sodium, du potassium et du chlore. Toutes proportions gardées, la cinétique de l'action est identique quelle que soit la voie d'administration.

c) Effets sur les excrétions du calcium, de l'ammonium, de l'acidité, du phosphate et de l'acide urique après administration par voie orale :

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant (tableau III. 2.).

Tableau III. 2.

Effets du T.S.S. chez le rat sur les excrétions du calcium, de l'ammonium, de l'acidité, de l'équivalence acide totale (E.A.T.) du phosphate monoacide et de l'acide urique après administration par voie orale.
(Moyenne de trois expériences)

Dose mg/kg	Elimination ionique en µEq/kg/6 heures					Acide urique µg/kg /6 h
	Ca^{2+}	NH_4^+	Acidité	E.A.T.	HPO_4^{2-}	
0	347	726	1229	1955	1853	3120
25	403	1056	1447	2503	2464	2993
50	742	922	1843	2765	2711	2892
100	785	1372	1908	3280	2071	4506
200	1142	1056	1738	2794	2086	5356

L'excrétion du calcium augmente avec la dose administrée. Il semblerait que la plupart des diurétiques exercent un effet analogue (HANZE 1960, POTTON et DESSIMOND 1963, THOMAS et coll. 1965, LARAGH et coll. 1966, GIROUD et SCHMITT 1968). Selon SCHUCK et CORT (1968), les variations des concentrations en sodium et en calcium dans la lumière tubulaire se feraient le plus souvent dans le même sens. EDWARDS et coll. (1973) ont observé, à partir d'études par microponctions sur le néphron du chien, que sous l'effet du furosémide les excrétions fractionnelles du sodium et du calcium se trouvaient augmentées dans des proportions équivalentes, tandis que, sous l'effet du chlorothiazide, ces variations étaient dissociées. Ils expliquent ces différences par le fait

que le chlorothiazide agit en inhibant la réabsorption du sodium dans une partie plus distale du segment de dilution. Si l'on compare les activités relatives du T.S.S. sur les excrétions du sodium et du calcium, on constate qu'elles augmentent parallèlement en fonction de la dose. Ceci constitue un argument qui permet d'apparenter l'action du T.S.S. à celle du furosémide.

Ces activités relatives, calculées à partir de trois expériences, s'expriment dans le tableau suivant (tableau III. 3.).

Tableau III. 3.

Activités relatives du T.S.S. sur les excrétions du sodium et du calcium chez le rat (Calculs à partir de trois expériences).

Dose mg/kg	Na^+	Ca^{2+}
25	1,74	1,16
50	2,44	2,13
100	2,57	2,26
200	4,02	3,29

Les excrétions de l'ammonium, de l'acidité et de l'E.A.T. sont également augmentées, mais dans des proportions moindres. Il est donc possible que le T.S.S. exerce une certaine action sur les systèmes d'acidification de l'urine.

L'élimination des phosphates est peu affectée. Les travaux de STRICKLER et coll. (1964), de GIEBISCH (1969) ont permis d'établir que la réabsorption active des ions phosphate s'effectuait principalement dans le tubule proximal, accessoirement dans le tubule distal . AGUS et GOLDBERG (1970), AGUS et coll. (1971) ainsi que STEELE (1971) ont indiqué que l'excrétion des phosphates pouvait rendre compte des modifications de la réabsorption proximale sous l'action d'un diurétique, une

diminution de la réabsorption proximale du sodium devant se traduire par une augmentation de l'excrétion phosphatée. Donc, le fait que l'élimination urinaire des phosphates soit légèrement augmentée peut laisser supposer une certaine action proximale du produit.

L'excrétion de l'acide urique paraît légèrement diminuée aux faibles doses et augmentée aux doses de 100 et 200 mg/kg. Un effet de ce type peut s'expliquer par la coexistence au niveau du tubule proximal de deux processus simultanés de sécrétion et de réabsorption, concernant à la fois l'acide urique et le T.S.S. et pouvant se modifier par effet de compétition (WEINER et MUDGE 1964, BOUDRY et ROCH-RAMEL 1969, BOUDRY 1971).

d) Comparaison des effets du T.S.S. avec ceux du chlorothiazide et ceux du furosémide :

Nous avons choisi d'établir ces comparaisons à partir des différences entre les quantités excrétées par les lots traités et les lots témoins pour 1 kg d'animal et pendant six heures. Ces comparaisons sont exprimées dans le tableau suivant (tableau III. 4.)

Tableau III. 4.

1°) Comparaison des effets du T.S.S. et du chlorothiazide par voie orale : (calculs à partir de six expériences)

Dose mg/kg	Augment. V urinaire en ml/kg/6 h		Augmentation de l'excrétion ionique en µEq/kg/6 h					
			Na^+		K^+		Cl^-	
	T.S.S.	chlor.	T.S.S.	chlor.	T.S.S.	chlor.	T.S.S.	chlor.
25	7,3	5,1	1281	975	355	581	1012	1391
50	11,2	6,3	2502	1031	596	596	2448	1462
100	13,4	9,3	2712	1326	528	769	2833	1829
200	49,9	8,5	5229	1388	1953	709	7360	1840

(La comparaison des effets du T.S.S. et du furosémide administrés par voie orale a été envisagée au chapitre précédent)

Tableau III. 4. (suite)

2°) Comparaison des effets du T.S.S. et du furosémide par voie intrapéritonéale : (calculs à partir de six expériences)

Dose mg/kg	Augment. V urinaire en ml/kg/6 h		Augmentation de l'excrétion ionique en µEq/kg/6 h					
			Na^+		K^+		Cl^-	
	T.S.S.	furos.	T.S.S.	furos.	T.S.S.	furos.	T.S.S.	furos.
25	6,7	59,3	1592	7130	1342	1526	2552	8697
50	23,8	65,5	3224	7592	1410	2335	4392	9144
100	50,2	75,5	6768	9138	2313	2774	8205	10476
200	42,1	85,0	5306	9195	2520	2845	7500	11520

Il apparaît que dans les conditions expérimentales choisies les effets du T.S.S. sont supérieurs à ceux du chlorothiazide par voie orale et inférieurs à ceux du furosémide par voie intrapéritonéale.

B. Chez le chien.

a) Effets chez le chien perfusé :

Six expériences ont été réalisées avec des doses de 10, 25 et 50 mg/kg. Bien que les résultats soient concordants, leur dispersion ne permet pas des calculs statistiques. Le tableau suivant (tableau III. 5.) rend compte des résultats fournis par l'une de ces expériences (expérience N° 3) avec une dose de 25 mg/kg. Les effets sont exprimés par les quantités réellement éliminées au cours des périodes de vingt minutes traduites en quantités moyennes par minute.

Avec cette dose on note un fort accroissement de la diurèse et de l'élimination du chlorure de sodium. L'excrétion du potassium est également augmentée, mais l'évolution du rapport Na/K reste très favorable. L'élimination du chlore dépasse celle du sodium pendant l'action diurétique.

Tableau III. 5.

Effets du T.S.S. chez le chien perfusé

Expérience N° 3 : Chien mâle 17 kg - Perfusion de solution de NaCl à 9 g/l à la vitesse de 3,75 ml/minute

Temps minutes	V ml/min.	pH	$U_{Na} \times V$ µEq/min.	$U_K \times V$ µEq/min.	$\frac{U_{Na}}{U_K}$	$U_{Cl} \times V$ µEq/min.	C_{In} ml/min.	C_{PAH} ml/min.	$\frac{V}{C_{In}} \times 100$	$\frac{C_{Na}}{C_{In}} \times 100$
-60 à -40	2,8	7,5	84	21	4,0	90	56,2	180,0	5,0	1,0
-40 -20	3,2	7,5	69	16	4,3	75	60,1	186,5	5,3	0,8
-20 0	2,9	7,6	62	18	3,4	68	55,4	188,7	5,2	0,8
Administration de T.S.S. 25 mg/kg dans le soluté de perfusion pendant l'heure suivante										
0 20	4,3	7,3	184	36	5,1	210	53,1	164,4	8,1	2,4
20 40	8,5	6,7	1017	174	5,9	1185	54,0	171,1	15,7	12,9
40 60	7,8	6,4	1011	99	10,2	1108	53,7	182,8	14,5	12,9
60 80	5,0	6,2	652	89	7,3	700	56,1	175,8	8,9	8,0
80 100	2,8	6,5	329	56	5,9	375	61,7	140,5	4,5	3,6
100 120	2,4	6,8	255	60	4,3	307	65,8	141,0	3,6	2,7

V : débit urinaire en ml/minute.

$U_{Na} \times V$: Excrétion du sodium en µEq/minute.

$U_K \times V$: Excrétion du potassium en µEq/minute.

$\frac{U_{Na}}{U_K}$: Rapport des concentrations urinaires du Na et du K.

$U_{Cl} \times V$: Excrétion du chlore en µEq/minute.

C_{In} : Clearance de l'inuline en ml/min. = Vitesse de filtration glomérulaire.

C_{PAH} : Clearance du P.A.H. = Débit plasmatique rénal.

Les urines s'acidifient légèrement pendant la phase d'activité.

Les clearances de l'inuline et de l'acide para-aminohippurique (P.A.H.) ne sont pratiquement pas modifiées, ce qui indique que la filtration glomérulaire et le débit plasmatique rénal ne sont guère affectés.

Les rapports $\frac{V}{C_{In}} \times 100$ et $\frac{C_{Na}}{C_{In}} \times 100$ expriment respectivement les pourcentages de l'eau et du sodium filtrés qui ont été excrétés. Ces pourcentages sont considérablement augmentés pendant la phase d'action diurétique.

Aucune modification de la glycémie, du taux d'urée sanguine, de la pression artérielle ni de l'électrocardiogramme n'a été observée.

b) Effets chez le chien non perfusé après administration du produit en une seule prise :

Deux expériences ont été réalisées avec des doses de 10 et 25 mg/kg. Avec une dose de 10 mg/kg, on observe des effets très voisins de ceux que l'on obtient avec une dose de 25 mg/kg. Les résultats de la première expérience sont figurés ci-dessous (figure III. 4.).

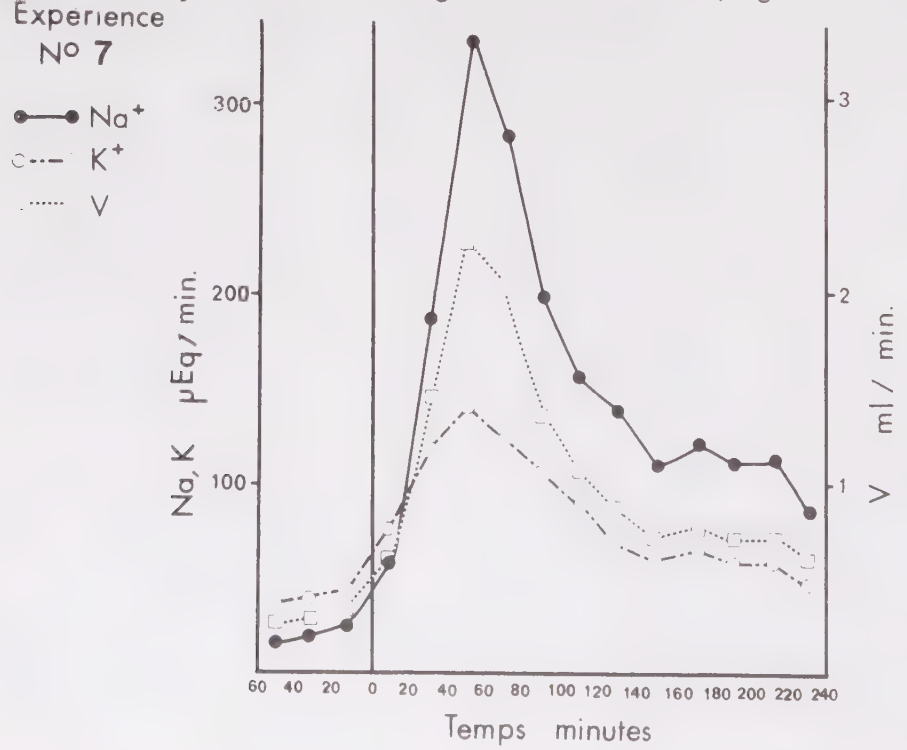


Fig III. 4. - *Effets du T.S.S. chez le chien non perfusé.*

3. DISCUSSION.

Dans tous les cas et sur les deux espèces animales utilisées, on observe sous l'action du produit une augmentation importante des excrétions de l'eau, du sodium et du chlore, cette dernière dépassant généralement celle du sodium pendant l'action diurétique.

L'élimination du potassium est également augmentée, mais le rapport Na/K s'accroît parallèlement.

Le pH diminue faiblement pendant l'action du produit, tandis que l'élimination des bicarbonates est peu affectée. On note cependant une certaine augmentation des excrétions de l'ammonium, de l'acidité, de l'équivalence acide totale.

L'augmentation de l'élimination du calcium est parallèle à celle du sodium, tandis que celle des phosphates est peu modifiée.

L'ensemble de ces caractères permet de considérer que le T.S.S., comme le T.S.T., est un agent saliurétique.

Son action se différencie de celle des diurétiques mercuriels et des antagonistes ou inhibiteurs de l'aldostérone. On sait en effet que ces produits inhibent la réabsorption du sodium au niveau des sites distaux d'échange de cet ion contre des ions K^+ et H^+ et qu'ils entraînent une diminution de l'excrétion de ces éléments.

Le T.S.S. n'agit pas par inhibition *in vivo* de l'anhydrase carbonique car il ne produit aucune augmentation du pH ni de l'excrétion du bicarbonate. Par ailleurs, il favorise principalement l'élimination des ions chlore.

Il paraît également exclu que l'action diurétique du produit puisse résulter d'une augmentation de la filtration glomérulaire et du débit plasmatique rénal.

L'hypothèse la plus vraisemblable est que le T.S.S. exercerait son action saliurétique par inhibition de la réabsorption du

sodium, ou peut-être du chlorure, soit au niveau du tubule proximal, soit plus probablement au niveau du segment de dilution. Son action s'apparenterait ainsi plus spécialement à celles du furosémide et de l'acide éthacrynique. Cette hypothèse doit être précisée au moyen de méthodes spécialisées.

Il faut souligner que les effets du T.S.S. sur le volume et l'osmolarité urinaire sont opposés à ceux de certains composés thioliques. Ainsi, SCHMID (1969) a pu observer que la cystéine, le 2,3 dimercapto 1-propanol, la S-(2-aminoéthyl)-isothiourée exerçaient une action voisine de celle de l'ADH en diminuant de façon marquée le volume urinaire et en augmentant l'osmolarité.

II. EFFETS DE QUELQUES ASSOCIATIONS DE DIURETIQUES AVEC LE T.S.S. CHEZ LE RAT.

Dans le but d'accréditer l'hypothèse précédente, nous avons étudié de manière succinte les effets du T.S.S. en association avec certains diurétiques dont le mécanisme et le lieu d'action sont relativement bien connus.

1. PRINCIPE DE LA METHODE. (BURGER 1968)

Lorsque deux diurétiques sont associés à faible dose, leurs effets s'additionnent s'ils appartiennent à une même série chimique; s'ils appartiennent à des séries différentes, leur association peut donner lieu à des phénomènes de synergie additive, de potentialisation ou encore d'antagonisme.

Lorsqu'un diurétique exerce son effet maximum, l'administration d'un second diurétique n'accroît l'effet du premier que s'il agit suivant un mécanisme au moins partiellement différent. Théoriquement, les effets s'additionnent si les deux produits exercent leur action suivant des modalités totalement différentes, à condition toutefois que la réactivité de l'animal le permette. Sous cette même réserve, la synergie n'est que partielle lorsque certains mécanismes d'action sont communs.

Enfin, l'effet maximum du produit administré en premier lieu ne peut être dépassé si le produit administré en second lieu agit suivant les mêmes modalités.

Ainsi, le furosémide est capable d'accroître la diurèse maximum provoquée par l'hydrochlorothiazide; par contre l'hydrochlorothiazide est sans effet sur la diurèse maximum produite par le furosémide. L'association du furosémide et de l'acide éthacrynique ne modifie pas l'effet maximum du produit administré le premier (HOOK et WILLIAMSON 1965a).

L'acide éthacrynique accroît les diurèses maxima induites par le chlorothiazide et le méralluride (BEYER et coll. 1965).

L'acétazolamide réduit, lorsqu'il est administré préalablement, la réponse à l'action du chlorothiazide. La chlormérodrine augmente la diurèse maxima provoquée par le chlorothiazide (PITTS et coll. 1958).

L'acétazolamide potentialise l'action du méralluride (MAREN 1958).

Compte tenu des réserves que nous avons faites, l'étude des effets des associations de diurétiques est dans la plupart des cas insuffisante pour déterminer un mécanisme d'action; elle présente néanmoins un intérêt certain pour étayer les résultats obtenus par d'autres méthodes.

Nous avons étudié les effets des associations du T.S.S. avec l'acétazolamide, le chlorothiazide, le furosémide et le triamtéréne. Nous avons également déterminé les effets du T.S.S. en association avec le dimercaprol ou B.A.L.(British Anti Lewisite) qui est susceptible d'inhiber l'action d'un diurétique capable de se lier aux fonctions thiol du récepteur (BEYER et coll. 1965).

2. TECHNIQUE.

Les expériences dont les résultats sontrapportés ci-dessus

ont été pratiquées sur le chien. Des techniques utilisant le rat ont été décrites par LIGHT (1959) et par ACETO et ICHNIOWSKI (1960).

Notre méthode d'essai des diurétiques chez le rat s'étant révélée satisfaisante, nous l'avons appliquée à l'étude des effets des associations de diurétiques.

Dans une première série d'expériences, nous avons choisi pour chaque produit, employé seul ou en association, les doses de 50 et 100 mg/kg.

Avec une dose de 50 mg/kg, aucun des diurétiques étudiés ne produit d'effet maximum dans les conditions expérimentales retenues. Leur association avec le T.S.S. permet donc dans ce cas la mise en évidence d'éventuels phénomènes de synergie, d'antagonisme ou de potentialisation.

Avec une dose de 100 mg/kg, le T.S.S. exerce, dans les mêmes conditions expérimentales, une action maximale, tandis que les produits associés produisent des effets marqués submaximaux.

Comme dans le protocole général précédemment décrit, les lots sont constitués de trois rats blancs Wistar de poid moyen 200 g, à jeun depuis dix-huit heures. Pour chaque expérience et chaque dose, nous employons deux lots témoins, deux lots recevant le T.S.S., deux lots recevant le produit associé et deux lots recevant les deux produits en association.

Le T.S.S. est administré par voie intrapéritonéale en solution dans la surcharge de soluté physiologique injectée à raison de 2,5 ml/100 g de rat. Les produit associés sont administrés *per os* en solution ou en suspension dans 2 ml de sirop simple. Pour l'étude des effets des associations, ils sont donnés immédiatement après le T.S.S..

La voie intrapéritonéale permettant une assimilation plus rapide, l'action du T.S.S. précède ainsi toujours celle du produit qui lui est associé.

Certains diurétiques, tels que le chlorothiazide et le triamtérène, qui exercent une action prolongée, ne produisent qu'une partie de leurs effets au cours de l'essai de 6 heures.

Le dimercaprol a été administré par voie intramusculaire.

Les expériences pratiquées avec des doses de 100 mg/kg se proposent donc d'étudier l'action du produit associé au cours de la diurèse maximale provoquée par le T.S.S..

Les effets du T.S.S. s'apparentant plus particulièrement à ceux du furosémide, nous avons également cherché à déterminer les effets de l'association au cours de la diurèse maxima produite par le furosémide. Dans cette deuxième série d'expériences, le furosémide a été administré à la dose de 200 mg/kg par voie intrapéritonéale, et le T.S.S. par voie orale à la dose de 100 mg/kg. Suivant ces modalités, l'action du furosémide précède ici celle du T.S.S.

3. RESULTATS.

Les résultats de ces expériences s'expriment dans le tableau suivant (tableau III. 6.), au moyen des augmentations des excrétions de l'eau, du sodium, du potassium, du chlore et, éventuellement du bicarbonate, pour 1 kg et pendant 6 heures.

Pour chaque type d'expérience figurent les effets de chaque produit employé seul, la somme théorique de leurs effets et l'effet réel de leur association.

Dans la première partie du tableau sont rapportés les effets correspondant à la première série d'expériences au cours desquelles l'action de différents produits vient se superposer à celle du T.S.S.. Chaque donnée représente la moyenne de quatre expériences.

Dans la deuxième partie du tableau sont rapportés les effets de l'association du T.S.S. avec le furosémide, lorsque l'action de ce dernier produit est maximale. Les chiffres expriment la moyenne de deux résultats.

Tableau III. 6.

Effets des associations du T.S.S. avec d'autres produits chez le rat.

1e partie : T.S.S. par voie intrapéritonéale + produit associé par voie orale (4 exp.)

	V ml/kg/6h		Na^+ µEq/kg/6h		K^+ µEq/kg/6h		Cl^- µEq/kg/6h		HCO_3^- µEq/kg/6h	
Dose mg/kg	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100
T.S.S.	33,4	48,5	3406	6086	1433	1912	3943	7873	-208	-50
Acétazolamide	15,7	20,0	2587	2369	1370	2050	-1637	-1697	5868	6510
S. des effets	49,1	68,5	5993	8455	2803	3962	2306	6176	5660	6460
Association	49,0	62,3	5573	8149	3140	3440	3753	7823	5060	6090
T.S.S.	32,2	58,2	3395	6730	1022	1557	4605	8501		
Chlorothiazide	4,2	17,2	1750	3117	627	1289	1100	4884		
S. des effets	36,4	75,4	5145	9847	1649	2846	5705	13385		
Association	34,2	70,7	5115	9109	977	2566	5242	11986		
T.S.S.	34,7	52,1	4089	6854	1272	1327	4621	7193		
Furosémide	56,6	60,2	4983	6972	1209	1640	6376	8216		
S. des effets	91,3	112,3	9072	13826	2481	2967	10997	15409		
Association	78,3	96,6	7594	9652	1402	1784	8471	10823		

Tableau III. 6. (suite)

	V ml/kg/6h		Na^+ µEq/kg/6h		K^+ µEq/kg/6h		Cl^- µEq/kg/6h		
Dose mg/kg	50	100	50	100	50	100	50	100	
T.S.S.	23,4	50,0	3041	6185	1609	2510	4009	7591	
Triamtérène	5,0	8,4	1675	2326	-667	-528	609	1325	
S. des effets	28,4	58,4	4716	8511	942	1982	4618	8916	
Association	28,4	38,4	5184	6547	-28	-36	5176	6518	
T.S.S.	31,7	55,0	4279	7555	1766	1958	5032	8220	
Dimercaprol	1,7	-3,3	-1381	-1366	21	116	-1343	-1520	
S. des effets	33,4	51,7	2898	6189	1787	2074	3689	6700	
Association	31,7	15,0	2519	2224	1656	846	3932	3222	

2e partie : Furosémide par voie intrapéritonéale (200 mg/kg) + T.S.S. par voie orale (100 mg/kg) (2 exp.)

Furosémide	80,6	9259	3040	11747	
T.S.S.	10,8	2492	738	2650	
S. des effets	91,4	11751	3778	14397	
Association	78,3	8395	2682	10786	

4. DISCUSSION.

A. Association T.S.S. + Acétazolamide.

Les effets sur les excrétions de l'eau, du sodium et du potassium sont sensiblement additifs. L'augmentation de l'excrétion du chlore sous l'effet de l'association n'est que très légèrement inférieure à celle qui est produite par le T.S.S. seul, mais cependant très supérieure à ce que représente la somme théorique des effets. L'excrétion du bicarbonate se trouve diminuée par rapport à celle que produit l'acétazolamide employé seul et par rapport à la somme des effets.

Ces résultats peuvent s'expliquer si l'on admet que les effets de l'acétazolamide au niveau proximal viennent se conjuguer à ceux que produit le T.S.S. lorsqu'il est censé agir au niveau du segment de dilution.

Il est possible que la réabsorption de l'ion bicarbonate soit favorisée par une augmentation de la sécrétion des ions H^+ sous l'effet du T.S.S.. Des effets similaires ont été observés à partir du furosémide et de l'acide éthacrynique (LARAGH et coll. 1966).

B. Association T.S.S. + Chlorothiazide.

Dans les deux cas, les effets de l'association sont légèrement inférieurs à la somme des effets des produits employés seuls.

Ces résultats laissent présumer des mécanismes d'action différents s'exerçant en des points différents.

C. Association T.S.S. + Furosémide.

Au cours de la diurèse maxima produite par le T.S.S., les effets de l'association sont toujours inférieurs à la somme des effets particuliers. La diurèse maxima provoquée par le T.S.S. est donc augmentée par le furosémide, mais les effets ne sont pas additifs. Par contre, la diurèse maxima produite par le furosémide n'est guère modifiée sous l'action du T.S.S.; elle paraît même légèrement diminuée.

Il apparaît donc que le T.S.S. et le furosémide agissent suivant des modalités communes, l'action du furosémide se révélant toutefois plus complète. Cela peut signifier que l'action du T.S.S. est plus localisée que celle du furosémide, ou bien qu'elle s'exerce aux mêmes niveaux avec une intensité moindre, la première hypothèse étant la plus vraisemblable d'après les observations précédentes.

D. Association T.S.S. + Triamtérène.

L'effet inhibiteur du triamtérène sur la sécrétion du potassium se manifeste également dans son association avec le T.S.S..

Avec des doses de 50 mg/kg, les effets de l'association sur les excrétions du chlore et du sodium dépassent la somme des effets de chaque produit employé seul; il semble donc que s'exerce une certaine potentialisation.

Avec des doses de 100 mg/kg, les effets traduiraient au contraire une légère action antagoniste.

Il est difficile d'interpréter de tels résultats.

E. Association T.S.S. + Dimercaprol.

Dans les deux cas le dimercaprol réduit les effets du T.S.S.. Son action est surtout marquée à la dose de 100 mg/kg.

Des effets de cette nature s'observent avec les diurétiques mercuriels ainsi qu'avec l'acide éthacrynique (BEYER et coll. 1965). Ils peuvent s'expliquer par le fait que l'affinité du métal ou du diurétique est plus importante pour les groupements -SH du B.A.L. que pour ceux des récepteurs rénaux.

L'action inhibitrice du dimercaprol vis à vis du T.S.S. permet de penser que ces deux composés sont susceptibles de former une combinaison inactive et que l'action diurétique peut résulter d'une fixation au niveau des récepteurs par l'intermédiaire des fonctions thiol.

Ces hypothèses seront examinées ultérieurement.

III. EFFETS DU T.S.S. CHEZ LE RAT DANS LES ETATS D'ACIDOSE ET D'ALCALOSE EXPERIMENTALES.

Certains diurétiques perdent leur activité chez l'animal en état d'acidose ou d'alcalose, cet état pouvant d'ailleurs résulter de l'action diurétique elle-même.

Par exemple, les diurétiques mercuriels voient leurs effets limités par l'alcalose hypochlorémique qu'ils provoquent par suite de la déplétion hydroélectrolytique (GIROUD et SCHMITT 1968). De même l'acétazolamide, entraînant une importante élimination de bicarbonate ainsi qu'une rétention de chlore, engendre une acidose hyperchlorémique qui annule les effets du produit (MAREN et coll. 1954). L'action de ces deux types de produits s'épuise au cours de l'administration répétée.

Ces mêmes inhibitions s'observent dans les états d'alcalose expérimentale pour les mercuriels, et dans les états d'acidose expérimentale pour l'acétazolamide. Les mercuriels par contre restent actifs dans les états d'acidose, ainsi que l'acétazolamide dans les états d'alcalose.

Parmi les autres diurétiques, le chlorothiazide (BEYER 1958), l'hydrochlorothiazide (BAER et coll. 1959), le furosémide (LARAGH et coll. 1966), l'acide éthacrynique (BEYER et coll. 1965), l'amiloride (BAER et coll. 1967) exercent leur action quel que soit l'état acido-basique et leurs effets ne s'épuisent pas lorsque l'administration est répétée.

Pour l'étude des modalités d'action du T.S.S., il était donc intéressant de déterminer ses effets dans les états d'acidose et d'alcalose expérimentales.

1. TECHNIQUES.

La majeure partie des études de ce type qui sont signalées dans la littérature ont été pratiquées chez le chien. Pour des raisons de commodité, nous avons préféré opérer chez le rat suivant la méthode précédemment décrite qui nous avait donné entière satisfaction.

Des protocoles permettant d'induire une acidose ou une alcalose expérimentale chez le rat ont été décrits par DAVIES et YUDKIN (1952), par LYON et PITTS (1969), par MALNIC et coll. (1970). Nous avons choisi la méthode de LYON et PITTS.

L'acidose est induite en donnant aux rats comme seule boisson, pendant les cinq jours qui précèdent l'expérience, une solution 0,28 M de chlorure d'ammonium (15 g/l). On sait que ce sel est transformé dans le foie en HCl.

L'alcalose est provoquée de la même manière en donnant une solution 0,28 M de bicarbonate de sodium (23,5 g/l).

Les expériences ont été conduites suivant le protocole habituel. Nous avons employé des doses de T.S.S. de 50 et de 100 mg/kg administrées par voie intrapéritonéale dans 2,5 ml/100 g de soluté physiologique. Pendant l'expérience, les animaux reçoivent comme boisson les solutions acidifiante ou alcalinisante.

2. RESULTATS.

Les résultats, représentant des moyennes obtenues à partir de six expériences, sont figurés dans les tableaux suivants (tableaux III. 7. et III. 8.).

3. DISCUSSION.

A. Expériences dans les états d'acidose expérimentale.

Les augmentations des excrétions de l'eau et du sodium sont comparables à celles qui résultent de l'action du T.S.S. lorsqu'il est employé chez le rat dans des conditions normales aux mêmes doses (cf. tableau III. 4.). L'augmentation de l'excrétion du chlorure est plus discrète. Dans tous les cas les éliminations ioniques sont très différentes par suite du traitement acidifiant.

Au cours de ces expériences, le pH de l'urine des animaux traités est apparu légèrement supérieur à celui de l'urine des animaux témoins.

Tableau III. 7.

Effets du T.S.S. dans les états d'acidose et d'alcalose expérimentale chez le rat. Valeurs des excrétions. (Moyenne de six expériences)

(*) Ecart type de la moyenne

Dose mg/kg	V. urinaire ml/kg/6h	Elimination ionique en µEq/kg/6h			
		Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-
1. Acidose.					
0	19,1 ± 2,5 *	432 ± 86	2309 ± 328	11124 ± 1163	
50	39,1 ± 2,6	3148 ± 506	3440 ± 319	13728 ± 942	
100	60,0 ± 7,0	6200 ± 894	3500 ± 210	16800 ± 1400	
2. Alcalose.					
0	26,6 ± 5,0	14896 ± 1805	2635 ± 254	1464 ± 142	16104 ± 1167
50	36,6 ± 5,2	10112 ± 1534	3318 ± 274	7072 ± 938	5824 ± 605
100	76,7 ± 8,0	13500 ± 1748	4698 ± 248	12137 ± 1300	6375 ± 524

Tableau III. 8.

Effets du T.S.S. dans les états d'acidose et d'alcalose expérimentale chez le rat. Variations des excrétions. (Moyenne de six expériences)

Dose mg/kg	Augment. V urinaire en ml/kg/6h	Variation de l'excrétion ionique en µEq/kg/6h			
		Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-
1. Acidose.					
50	20,0	2716	1131	2604	
100	40,9	5768	1191	5476	
2. Alcalose.					
50	10,0	-4784	683	5608	-10280
100	50,1	-1394	2063	10673	-9729

Au cours de quatre expériences, les pH urinaires observés ont présenté les valeurs suivantes :

Animaux témoins	Animaux traités	
	50 mg/kg	100 mg/kg
5,80	6,15	6,00
5,65	6,10	5,95
5,75	6,25	6,25
5,55	6,20	6,35

Il n'est pas possible, dans l'état actuel de ce travail, de formuler une hypothèse explicative sur le mécanisme entraînant la diminution de l'acidité urinaire. Un abaissement du pH de l'urine de chiens en état d'acidose expérimentale a été observé par BEYER et coll. (1965) après administration d'acide éthacrynique; aucune explication de ce phénomène n'a été proposée par ces auteurs.

Malgré certaines particularités, nous devons donc admettre que le T.S.S. exerce chez l'animal en état d'acidose expérimentale le même type d'action que chez l'animal en état normal.

B. Expériences dans les états d'alcalose expérimentale.

Les excrétions de l'eau, du potassium et du chlore présentent des variations du même ordre de grandeur que celles que l'on peut observer, sous l'effet du T.S.S., dans les conditions normales. On peut signaler toutefois que l'excrétion du chlorure est légèrement inférieure chez les animaux témoins en état d'alcalose.

L'excrétion du sodium est, par contre, très importante chez les témoins, mais elle diminue sous l'action du produit. Cette diminution est plus marquée avec une dose de 50 mg/kg.

L'excrétion du bicarbonate, très élevée chez les témoins, se trouve également diminuée sous l'action du T.S.S.; cette diminution est dans tous les cas plus importante que la diminution de l'élimination du sodium.

Le pH de l'urine des animaux traités est inférieur à celui de l'urine des animaux témoins, et sa diminution est fonction de l'importance de la dose administrée. Par exemple, au cours de quatre expériences, les pH urinaires observés ont présenté les valeurs suivantes :

Animaux témoins	Animaux traités	
	50 mg/kg	100 mg/kg
8,15	7,20	6,85
8,25	7,90	7,10
8,25	8,00	7,20
8,10	7,75	7,15

Il paraît acquis, d'après des travaux récents de MALNIC et MELLO-AIRES (1971) et de ULLRICH et coll. (1971), que la réabsorption de l'ion bicarbonate s'effectue en grande partie au niveau proximal et qu'elle s'accompagne toujours de la réabsorption d'un ion Na^+ et de la sécrétion d'un ion H^+ qui participe en fait au processus de transfert. Nous pouvons ainsi considérer que la diminution de l'excrétion du bicarbonate entraîne une diminution équivalente de l'excrétion du sodium. Or, la réduction de l'élimination est moins importante pour le sodium que pour le bicarbonate. Nous pouvons donc admettre que, sous l'action du T.S.S., du sodium est soustrait à la réabsorption en même temps qu'une quantité équivalente de chlorure, vraisemblablement au niveau de l'anse de HENLE (WALLIN, BARRATT et coll., WALLIN, BRENNAN et coll.1973).

Si, dans cette optique, nous établissons un bilan des transferts du sodium, nous obtenons les résultats suivants (en µEq/kg/6h) :

Dose en mg/kg	50	100
Diminution de l'excrétion du Na par réabsorption de $NaHCO_3$	-10280	-9729
Augmentation de l'excrétion du Na par action du T.S.S. sur l'anse de HENLE	5608	10673
Variation théorique de l'apport distal du Na	-4672	944
Variation observée de l'excrétion du Na	-4724	-1394
Variation de l'excrétion de Na + K	-4161	669

Nous constatons que la variation de la somme des excrétions du sodium et du potassium est du même ordre de grandeur que la variation théorique de l'apport distal du sodium.

En admettant que la majeure partie du potassium excrété provient des échanges distaux contre du sodium, ces résultats nous conduisent à proposer l'interprétation suivante :

- sous l'action du T.S.S., la réabsorption du $NaHCO_3$ se trouve augmentée,
- la réabsorption du NaCl se trouve diminuée au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE,
- les mécanismes distaux d'échange et d'acidification confèrent à l'excrétion ionique son caractère définitif.

Des effets similaires, cependant moins marqués, ont été observés sous l'action du furosémide et de l'acide éthacrynique (BEYER et coll. 1965, LARAGH et coll. 1966).

Il paraît difficile, à première vue, de formuler une hypothése sur le mécanisme par lequel le T.S.S. favorise la réabsorption du bicarbonate. Cette action pourrait se trouver liée au processus de sécrétion du produit (ULLRICH et coll. 1971). En tout état de cause, ce phénomène requiert l'intervention de l'anhydrase carbonique. En effet, lorsque le T.S.S. est employé en association avec l'acétazolamide qui est un inhibiteur de cet enzyme, l'excrétion du bicarbonate induite par l'acétazolamide n'est que légèrement diminuée (voir tableau III. 6.).

L'interprétation des faits expérimentaux révèle donc que le T.S.S. exerce chez l'animal en état d'alcalose expérimentale le même type d'action diurétique que chez l'animal en état normal.

IV. EFFETS DU T.S.S. CHEZ LE LAPIN, LE COBAYE ET LA SOURIS.

Après avoir étudié les effets du T.S.S. chez le rat et chez le chien, nous avons cherché à savoir si ce produit était également actif chez d'autres animaux de laboratoire. A cet effet, nous l'avons expérimenté chez le lapin, le cobaye et la souris.

1. TECHNIQUES.

Chez le lapin et chez le cobaye, nous avons employé le protocole décrit au début de ce chapitre pour l'expérimentation chez le chien. Le soluté physiologique a été perfusé à la vitesse de 1 ml par minute, et le T.S.S. a été donné à la dose de 25 mg/kg dans le soluté de perfusion. Les urines ont été recueillies après chaque heure.

Les essais ont été pratiqués chez la souris dans les mêmes conditions que chez le rat. Nous n'avons mesuré que les effets sur la diurèse d'une dose de 100 mg/kg, administrée par voie intrapéritonéale.

Les résultats obtenus étant suffisamment probants, nous n'avons réalisé, chez les trois espèces animales, qu'une seule expérience, pour obtenir simplement un profil d'action du T.S.S..

2. RESULTATS.

Les résultats s'expriment dans les tableaux suivants (tableaux III. 9. et III. 10.).

Tableau III. 9

Effets du T.S.S. chez le lapin perfusé

Lapin femelle 3,1 kg - Perfusion de soluté physiologique 1 ml/minute

Temps minutes	V ml/heure	pH	$U_{Na} \times V$ µEq/h	$U_{K} \times V$ µEq/h	$U_{Cl} \times V$ µEq/h
-60 à 0	24	8,10	3264	216	3000
Administration de T.S.S. 25 mg/kg pendant 1'heure suivante					
0 60	100	7,70	13000	600	13300
60 120	80	7,60	9920	560	10400
120 180	49	7,55	5952	480	6384

Tableau III. 10.

Effets du T.S.S. chez le cobaye perfusé.

Cobaye mâle 0,78 kg - Perfusion de soluté physiologique 1 ml/minute

Temps minutes	V ml/heure	pH	U_{Na} x V µEq/h	U_K x V µEq/h	U_{Cl} x V µEq/h
-60 à 0	21	7,40	2604	210	2835
Administration de T.S.S. 25 mg/kg pendant 1'heure suivante					
0 60	71	6,80	9230	355	10437
60 120	50	6,80	6700	250	7250

Effets du T.S.S. chez la souris

Deux lots de 12 souris mâles - Administration de T.S.S. à la dose de 100 mg/kg par voie intrapéritonéale aux animaux d'un des lots, l'autre servant de témoin. (poids moyen de chaque souris : 20 g)

Augmentation de la diurèse par rapport au lot témoin : 30 ml/kg/6h

Ces résultats montrent que l'activité du T.S.S. est aussi importante chez le lapin, le cobaye et la souris que chez le rat et chez le chien.

V. EFFETS COMPARES DU T.S.S. ET DU O.S.S. CHEZ LE CHIEN.

Nous avons comparé chez le chien les effets du T.S.S. avec ceux du (oxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de sodium, que nous pouvons désigner par ses initiales O.S.S.. Ce produit, qui est l'homologue onique du T.S.S., n'exerce, chez le rat, qu'une faible activité diurétique (voir Chapitre II. - tableaux II. 2. et II. 3.).

Il était intéressant d'évaluer chez le chien les effets de la désulfuration du T.S.S. sur l'activité diurétique, comme cela avait été fait chez le rat.

Les essais ont été pratiqués chez le chien perfusé, dans les conditions précédemment décrites, avec des doses de 10 et de 25 mg/kg.

Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant (tableau III. 11.). Ils montrent que, pour une même dose, les effets du T.S.S. chez le chien sont beaucoup plus marqués que ceux du O.S.S.. La disparité paraît d'autant plus accentuée que la dose est plus élevée.

Ces résultats sont comparables à ceux qui ont été observés chez le rat et qui sont rapportés au chapitre II (tableau II. 3.). Ils confirment l'importance du rôle de la fonction thione dans l'action diurétique.

VI. TOXICITE.

Au cours des expériences précédentes, aucune manifestation toxique n'a été observée. Dans le cadre limité de nos investigations, aucune perturbation métabolique n'a été décelée.

La DL50 a été déterminée chez la souris, suivant la méthode classique, pour trois produits seulement. Les résultats sont les suivants après administration par voie intrapéritonéale :

Produits	DL50
T.S.T.	400 mg/kg
T.S.S.	400 mg/kg
(sulfamoyl-5 thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3	750 mg/kg

Aucune étude de toxicité chronique n'a été réalisée.

VII. CONCLUSIONS.

Le T.S.S. s'est montré actif chez toutes les espèces animales utilisées : rat, chien, lapin, cobaye, souris.

Ses effets marqués sur les excrétions de l'eau et du NaCl permettent de le considérer comme un agent saliurétique.

Tableau III. 11.

Effets comparés du T.S.S. et du O.S.S. chez le chien.

Perfusion de solution de NaCl à 9 g/l à la vitesse de 3,75 ml/minute

	Dose 10 mg/kg						Dose 25 mg/kg					
	T.S.S.			O.S.S.			T.S.S.			O.S.S.		
	chien mâle 16 kg			chien mâle 15 kg			chien mâle 17 kg			chien femelle 17 kg		
Temps minutes	V	U_{Na} x V	U_K x V	V	U_{Na} x V	U_K x V	V	U_{Na} x V	U_K x V	V	U_{Na} x V	U_K x V
-40 à -20	0,3	12	25	2,8	36	34	3,2	69	16	0,4	82	26
-20 0	0,3	14	30	2,5	29	31	2,9	62	18	0,4	84	28
	T.S.S. 10 mg/kg I.V.			O.S.S. 10 mg/kg I.V.			T.S.S. 25 mg/kg I.V.			O.S.S. 25 mg/kg I.V.		
0 20	0,6	61	72	2,0	120	45	4,3	184	36	0,4	77	31
20 40	1,4	186	116	2,8	196	43	8,5	1017	174	0,8	128	46
40 60	2,2	330	136	2,2	123	33	7,8	1011	99	1,1	183	53
60 80	2,1	280	122	2,1	118	31	5,0	652	89	1,3	204	51
80 100	1,3	200	102	2,0	120	31	2,8	329	56	1,6	230	67
100 120	1,1	158	86	2,0	112	30	2,4	255	60	1,8	234	66

V : Débit urinaire en ml/minute

U_{Na} x V : Excrétion du sodium en µEq/minute

U_K x V : Excrétion du potassium en µEq/minute

Il favorise la sécrétion des ions H^+ surtout au niveau proximal.

Son action s'exerce quel que soit l'état acido-basique.

Les effets du T.S.S. s'apparentent à ceux du furosémide et de l'acide éthacrynique. Ses modalités d'action doivent cependant différer de celles de l'acide éthacrynique, puisque ce dernier composé est inactif chez le rat.

L'étude des effets des associations permet de penser que le T.S.S. et le furosémide pourraient agir suivant certaines modalités communes, l'action du furosémide paraissant toutefois plus étendue que celle du T.S.S..

L'hypothèse la plus vraisemblable est que le T.S.S. inhiberait la réabsorption du sodium, ou du chlorure, ou du NaCl au niveau du segment de dilution, une action proximale n'étant pas totalement exclue.

Cette hypothèse doit être confirmée et précisée au moyen de méthodes spécialisées.

C H A P I T R E I V

RECHERCHE DU LIEU D'ACTION DU T.S.S.

Après avoir émis l'hypothèse que le T.S.S. pourrait exercer son action au niveau du segment de dilution et, accessoirement au niveau du tubule proximal, il est nécessaire, pour la confirmer et la préciser, de recourir à des techniques plus précises.

I. CHOIX DES METHODES.

Classiquement, on peut envisager de faire appel pour cette étude à quatre types de méthodes :

- la méthode de la diurèse interrompue ou "stop-flow method",
- les différentes microtechniques (microponctions, microanalyses,...),
- la méthode dite des "clearances",
- la méthode d'étude des gradients intra-rénaux.

La méthode de la diurèse interrompue, introduite en 1958 par MALVIN (MALVIN et coll. 1958a et 1958b, WILDE et MALVIN 1958), a été largement utilisée pour rechercher les points d'action des diurétiques. Le principe en est simple. Chez un animal en état de polyurie expérimentale, l'uretère est cathétérisé aussi près que possible du rein et le cathéter est clampé. De ce fait, le courant urinaire est interrompu, la pression intratubulaire s'élève et la filtration glomérulaire cesse. A la faveur de la stase du liquide tubulaire, sa composition se modifie en chaque point en fonction des propriétés d'échange des cellules de la paroi.

Lorsque le courant urinaire est rétabli après la levée du clamp, le liquide tubulaire s'évacue rapidement du fait de la polyurie, suffisamment vite pour que les échanges susceptibles de se produire avant la sortie du tube collecteur ne modifient que très superficiellement les effets établis pendant la stase. L'écoulement urinaire apporte successivement les liquides provenant du bassinet, puis des tubes collecteurs, des tubules distaux, de l'anse de HENLE, des tubules proximaux et du glomérule, jusqu'à ce que soient rétablies les conditions de la diurèse libre. L'analyse des échantillons successifs permet donc, dans une certaine mesure, de connaître la nature et l'importance des échanges dans les différentes parties du néphron. Par comparaison des résultats obtenus avant et après l'administration d'un diurétique, on peut donc espérer localiser son action.

Cette méthode n'est pas exempte de critiques. Ses défauts ont été signalés en particulier par ORLOFF (1966). L'interruption de la diurèse modifie les conditions normales de fonctionnement du rein et, de ce fait, introduit de multiples causes d'erreurs. D'autre part, le fluide tubulaire recueilli provient de néphrons de longueurs différentes. Enfin, ce liquide peut subir des modifications dans les parties plus distales du néphron avant d'être excrété.

La plupart des conclusions qui avaient été établies à partir de cette technique ont été contredites à partir d'études plus récentes faisant appel aux microtechniques (BANK 1968). Sous sa forme initiale, la méthode de "stop-flow" ne semble présenter d'intérêt que pour l'étude d'une action distale (NIELSEN et LASSEN 1963). Associée aux microtechniques qui permettent de suivre les variations de composition du liquide tubulaire en un point précis, elle peut conduire à des résultats intéressants (MAUDE 1968).

Les microtechniques sont aujourd'hui d'un usage courant. Elles ont été appliquées pour la première fois à l'étude du néphron par WALKER et coll. (1941). Leur essor a été largement favorisé par les progrès de la microanalyse.

L'emploi de ces méthodes a permis, au cours des dernières années,de réaliser des progrès importants dans les domaines de la physiologie et de la pharmacologie rénales (ULLRICH 1962, ULLRICH et coll. 1966).

Les principaux travaux, ainsi que leurs résultats, ont été rapportés par BANK (1968), WINDHAGER (1968b), ORLOFF et BURG (1971). Ces deux derniers auteurs ont signalé les défauts de certaines techniques et critiqué de nombreux résultats.

Parmi les microméthodes les plus modernes, nous devons signaler l'utilisation de la microsonde électronique par MOREL et ROINEL (1969) pour le dosage des substances ioniques.

La pratique des microméthodes exigeant la mise en œuvre d'un matériel particulier et la participation d'un personnel expérimenté, ne peut se réaliser que dans des laboratoires spécialisés.

Compte tenu des moyens dont nous disposions et des buts recherchés, nous avons choisi d'aborder le problème de la localisation de l'action du T.S.S. en faisant appel à des méthodes d'étude dont la mise en oeuvre était relativement simple. Nous avons employé la méthode des "clearances" et l'étude des gradients intra-rénaux qui nous ont paru en mesure d'apporter les arguments nécessaires à notre hypothèse de départ.

II. ETUDE PAR LA METHODE DES CLEARANCES.

La méthode des "clearances" se propose de définir le lieu d'action d'un diurétique à partir des variations du volume urinaire, de la clearance osmolaire, de la clearance de l'eau libre en diurèse aqueuse et de la réabsorption de l'eau libre en hydropénie.

Elle trouve son origine dans une série de travaux parmi lesquels nous pouvons citer ceux de WESSON et ANSLOW (1952), de ZAK et coll. (1954), de BERLINER et coll. (1958), de HEINEMANN et BECKER (1958), de PITTS (1958), de HEINEMANN et coll. (1959), de EARLEY et coll. (1961), de GOLDBERG, Mc CURDY et coll. (1964), de SUKI et coll. (1965), qui ont conduit SELDIN, EKNOYAN, SUKI et RECTOR à définir le principe et la portée de la méthode (SELDIN et coll. 1966, EKNOYAN et coll. 1967).

Cette méthode a été largement employée pour préciser les sites d'action de tous les types de diurétiques (BANK 1968, GIROUD et

SCHMITT 1968, WEPIERRE 1969, ROSIN et coll. 1970, WILSON et KIRKENDALL 1970). Sa valeur a été confirmée par les microtechniques et les études des gradients de concentration (BEYER et coll. 1965, HOOK et WILLIAMSON 1965c, BERLINER et coll. 1966, DEETJEN 1966, GOLDBERG 1966).

1. PRINCIPE DE LA METHODE.

Le principe de la méthode a été exposé dans deux communications antérieures (DARTIGUES 1971; DARTIGUES, ROQUEBERT et coll. 1972b); nous allons cependant en rappeler les points essentiels.

Toute modification des conditions de la réabsorption des ions, principalement du sodium, au niveau du tubule proximal comme au niveau du segment de dilution, est susceptible de causer des variations du débit urinaire, de la clearance osmolaire, de la clearance et de la réabsorption de l'eau libre, qui sont caractéristiques du lieu où s'exerce cette action.

Nous allons définir le sens de ces variations suivant le point au niveau duquel agit un produit.

Au niveau du tubule proximal, où la réabsorption est isotonique, une action inhibitrice augmente l'apport de liquide isotonique aux parties plus distales du néphron. Théoriquement, ceci doit entraîner un hyperfonctionnement des segments suivants et se traduire par une augmentation des éliminations de l'eau, des ions, de la clearance osmolaire, de la clearance de l'eau libre en diurèse aqueuse et de sa réabsorption en hydropénie. IL semblerait toutefois qu'une action de ce type ne puisse avoir que des effets limités, car elle entraînerait une dilatation tubulaire contrariant l'action du produit. Comme nous l'avons signalé par ailleurs, selon BANK (1968), un composé ne serait en mesure de produire des effets saliurétiques importants qu'à la condition que son action s'exerce au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE. L'inhibition de la réabsorption proximale du sodium semble cependant rendre compte d'une partie des effets du furosémide et de l'acide éthacrynique, et peut-être des mercuriels. Seule l'action de l'acétazolamide paraît importante à ce niveau et susceptible de produire des effets marqués, du fait que le bicarbonate de Na soustrait à la réabsorption trouve difficilement le moyen d'être réabsorbé dans les segments suivants.

Au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE et du début du tubule distal se situe le segment de dilution comprenant une partie médullaire et une partie corticale.

Dans la partie médullaire, l'inhibition de la réabsorption entraîne l'augmentation de la clearance osmolaire et la disparition du gradient cortico-papillaire. L'eau cessant alors d'être réabsorbée dans la branche descendante, le débit augmente. En diurèse aqueuse, l'urine distale est moins hypotonique; comme elle n'est guère modifiée au cours de la traversée du tube collecteur imperméable à l'eau, C_{H2O} tend à diminuer. En hydropénie, la disparition du gradient cortico-papillaire empêche la réabsorption de l'eau libre hors du tube collecteur, ce qui a pour effet de diminuer TC_{H2O}.

Dans la partie corticale du segment de dilution, l'inhibition de la réabsorption entraîne l'augmentation de la clearance osmolaire, mais n'affecte pas le gradient cortico-papillaire. Les conditions nécessaires à la réabsorption de l'eau n'étant guère modifiées, le volume urinaire reste théoriquement inchangé. En diurèse aqueuse, l'urine devient plus diluée et la clearance de l'eau libre diminue. En hydropénie, la réabsorption de l'eau libre n'étant pas modifiée, TC_{H2O} reste constante.

Ces différents effets peuvent se schématiser dans le tableau suivant (tableau IV. 1.) (SELDIN et coll. 1966, WEPIERRE 1969).

Tableau IV. 1.

Effets en fonction du lieu d'action d'un diurétique

Lieu d'action	Modifications provoquées			
	V	C_{osm}	C_{H2O}	TC_{H2O}
Tubule proximal :	↗	↗	↗	↗
Segment de dilution :				
- médullaire	↗	↗	↘	↘
- cortical	=	↗	↘	=

Les résultats obsèrvés sont parfois difficiles à interpréter. Ce peut être le cas pour un diurétique exerçant une action étendue. Il faut également considérer qu'une action localisée peut produire des effets qui se trouvent ensuite modifiés dans les parties plus distales du néphron.

Si la méthode des clearances ne peut apporter dans tous les cas une réponse précise, elle constitue néanmoins le meilleur moyen de définir la résultante de l'action d'un diurétique sur les mécanismes de concentration-dilution. Elle reste de ce fait une méthode d'actualité.

2. TECHNIQUE.

Les expériences ont été réalisées suivant un protocole original qui peut s'employer pour tout produit hydrosoluble susceptible de s'administrer en perfusion.

Nous avons choisi d'opérer sur des chiens anesthésiés, dans des conditions de perfusion constante qui assurent un débit urinaire stable pendant un temps suffisamment long, de telle sorte que toute modification dans les conditions de la diurèse, qui survient après l'administration du produit, puisse être imputé à son action.

Le protocole général de l'essai a été décrit dans le chapitre III. Nous n'indiquerons ici que les modalités particulières à la diurèse aqueuse et à la diurèse saline hypertonique.

A. Diurèse aqueuse.

Les animaux sont privés de nourriture, mais pas de boisson, pendant les vingt-quatre heures qui précèdent l'expérience.

Au début de l'essai, les chiens reçoivent par tubage gastrique une surcharge hydrique de 50 ml/kg. L'hydratation est complétée par la perfusion, après l'anesthésie, d'une solution hypotonique de glucose à 30 g/l ou de NaCl 0,1 M à la vitesse de 5 à 7 ml/minute.

Le liquide perfusé contient également de l'inuline (3 g/l), de l'acide para-amino-hippurique (0,4 g/l) pour mesurer les clearances correspondantes, ainsi que du nembutal (5 mg/kg/heure) pour entretenir l'anesthésie.

L'épreuve se déroule en trois phases suivant le protocole déjà décrit. Les prélèvements sont effectués toutes les vingt minutes.

B. Diurèse saline hypertonique.

Nous avons préféré étudier les variations de la réabsorption de l'eau libre sur des animaux en état de diurèse saline hypertonique, plutôt que dans des conditions d'hydropénie réelle. Nous avons choisi cette solution pour plusieurs raisons.

Dans les expériences réalisées en hydropénie, le débit urinaire est très faible pendant la phase de contrôle, et les clearances correspondantes ne peuvent être déterminées avec précision.

D'autre part, la nécessité de mesurer pendant plusieurs heures des variations de clearances impose un régime de perfusion constant pour l'inuline et le P.A.H..

Cette manière d'opérer évite par ailleurs tout apport liquidien supplémentaire au moment de l'administration du produit. Elle s'impose pour un produit assez peu soluble, comme le T.S.S., qui doit être véhiculé par une quantité importante de liquide.

Il est prouvé que la perfusion de liquide hypertonique réduit le gradient de concentration cortico-papillaire, mais de nombreuses expériences (HOOK et WILLIAMSON 1965c, GOLDBERG 1966, HELLER et VOSTAL 1967, IMBS et coll. 1970) montrent que, dans les conditions choisies, il reste suffisamment important pour que son abolition sous l'action d'un diurétique entraîne des effets marqués.

Les chiens sont privés de boisson et de nourriture pendant les vingt-quatre heures qui précèdent l'expérience.

Aussitôt après l'anesthésie, les animaux reçoivent par voie intramusculaire 5 U.I. d'extrait post-hypophysaire. Il leur est ensuite administré en perfusion une solution hypertonique de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 5 à 7 ml/minute. Cette solution contient également de l'inuline, du P.A.H., du nembutal ainsi que de l'extrait post-hypophysaire (50 mU par kg et par heure).

C. Méthodes chimiques.

Les méthodes de détermination du pH et de dosage du sodium, du potassium, du chlorure, de l'inuline et du P.A.H. ont été indiquées précédemment. Les osmolarités ont été mesurées par cryoscopie, au moyen d'un appareil ACTA.

3. RESULTATS.

Six expériences ont été réalisées en diurèse aqueuse et quatre en diurèse saline hypertonique. Si les valeurs des excrétions diffèrent d'un animal à l'autre, leurs variations sous l'effet du produit s'effectuent toujours dans le même sens.

Les résultats d'une expérience en diurèse aqueuse et d'une expérience en diurèse saline hypertonique sont rapportés dans les tableaux suivants (tableaux IV. 2. et IV. 3.) à titre d'exemple.

Les variations des rapports des osmolarités de l'urine et du plasma, ainsi que les variations des clearances et des réabsorptions de l'eau libre pour 100 ml de filtrat glomérulaire, au cours de trois expériences en diurèse aqueuse et de trois expériences en diurèse saline hypertonique, sur des animaux de poids voisins, sont consignées dans le tableau IV. 4..

A. Effet et durée d'action du produit.

Dans les conditions expérimentales choisies, l'effet du T.S.S. se manifeste au bout de quelques minutes; il est maximum à la fin de la première heure et décroît ensuite lentement.

Tableau IV. 2.

Effets du T.S.S. chez le chien perfusé en diurèse aqueuse

Expérience N° 15 : Chien femelle 16 kg - Perfusion de solution de NaCl 0,1 M à la vitesse de 5 ml/minute

Temps minutes	V ml/min.	pH	$U_{Na} \times V$ µEq/min	$U_K \times V$ µEq/min	$U_{Cl} \times V$ µEq/min	C_{In} ml/min.	C_{PAH} ml/min.	$\frac{V}{C_{In}} \times 100$	$\frac{C_{Na}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	C_{osm} ml/min.	C_{H_2O} ml/min.	$\frac{C_{H_2O}}{C_{In}} \times 100$
-60 à -40	2,8	7,9	35	28	35	54,9	165	5,1	0,4	0,39	1,7	1,1	2,0
-40 -20	3,1	7,9	78	31	56	53,4	161	5,8	1,0	0,41	1,3	1,8	2,3
-20 0	3,0	7,9	83	29	66	60,0	175	5,0	0,9	0,41	1,2	1,8	2,0
Administration de T.S.S. 25 mg/kg dans le soluté de perfusion pendant l'heure suivante													
0 20	2,9	7,9	75	32	61	60,1	165	4,8	0,8	0,41	1,2	1,7	2,8
20 40	6,7	7,5	446	64	556	73,0	168	9,2	4,4	0,63	4,2	2,5	3,4
40 60	10,1	7,3	899	86	1131	62,2	107	16,3	10,4	0,75	7,5	2,6	4,2
60 80	7,2	7,3	641	61	792	51,4	100	14,1	9,0	0,79	5,7	1,5	2,9
80 100	4,0	7,4	300	42	376	41,0	83	9,8	5,2	0,66	2,6	1,4	3,4
100 120	2,8	7,4	143	32	204	42,5	80	6,6	2,5	0,42	1,2	1,6	3,8

V : Débit urinaire en ml/minute

$U_{Na} \times V$: Excrétion du sodium en µEq/minute

$U_K \times V$: Excrétion du potassium en µEq/minute

$U_{Cl} \times V$: Excrétion du chlore en µEq/minute

C_{In} : Clearance de l'inuline = Débit de filtration glomérulaire

C_{PAH} : Clearance du P.A.H. = Débit plasmatique rénal

$V/C_{In} \times 100$: Pourcentage du volume filtré excrété

$C_{Na}/C_{In} \times 100$: Pourcentage du sodium filtré excrété

U_{osm}/P_{osm} : Osmolarité de l'urine/Osm. du plasma

C_{osm} : Clearance osmolaire

C_{H_2O} : Clearance de l'eau libre

$C_{H_2O}/C_{In} \times 100$: C_{H2O} rapportée à 100 ml/mn de filtrat

Tableau IV. 3.

Effets du T.S.S. chez le chien perfusé en diurèse saline hypertonique

Expérience N° 18 : Chien mâle 14 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 7 ml/minute

Temps minutes	V ml/min.	pH	$U_{Na} \times V$ µEq/min	$U_K \times V$ µEq/min	$U_{Cl} \times V$ µEq/min	C_{In} ml/min.	C_{PAH} ml/min.	$\frac{V}{C_{In}} \times 100$	$\frac{C_{Na}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	C_{osm} ml/min.	TC_{H_2O} ml/min.	$\frac{TC_{H_2O}}{C_{In}} \times 100$
-60 à -40	5,4	7,6	869	27	1107	38,7	100	13,9	12,4	1,33	7,2	1,8	4,7
-40 -20	6,8	8,7	1040	27	1380	40,4	111	16,8	13,0	1,39	9,4	2,6	6,5
-20 0	6,2	7,7	998	25	1352	46,8	113	13,2	10,9	1,42	8,6	2,6	5,6
Administration de T.S.S. 25 mg/kg dans le soluté de perfusion pendant l'heure suivante													
0 20	7,8	7,6	1622	82	1716	47,4	108	16,5	20,7	1,37	10,7	2,9	6,1
20 40	17,0	7,4	3230	153	3230	56,4	103	30,1	35,3	1,13	19,2	2,2	3,9
40 60	15,7	7,5	2795	118	2967	43,7	67	35,9	37,5	1,05	16,5	0,8	1,8
60 80	15,1	7,0	2597	106	3080	51,2	77	29,5	31,3	1,15	17,3	2,2	4,3
80 100	10,2	7,5	1846	77	2203	42,9	76	23,8	25,4	1,16	11,9	1,7	3,9
100 120	7,1	8,0	1377	75	1633	38,3	70	18,4	20,8	1,28	9,1	2,0	5,2

TC_{H_2O} : Réabsorption de l'eau libre en ml/minute

$\frac{TC_{H_2O}}{C_{In}} \times 100$: Réabsorption de l'eau libre rapportée à 100 ml/minute de filtrat glomérulaire

Tableau IV. 4.

Variations des rapports $\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$, $\frac{C_{H_2O}}{C_{In}} \times 100$ et $\frac{TC_{H_2O}}{C_{In}} \times 100$ au cours de six expériences

	Diurèse aqueuse						Diurèse saline hypertonique					
Exp. N° →	10		15		17		11		13		18	
Temps minutes	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	$\frac{C_{H2O}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	$\frac{C_{H2O}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	$\frac{C_{H2O}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	$\frac{TC_{H2O}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	$\frac{TC_{H2O}}{C_{In}} \times 100$	$\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$	$\frac{TC_{H2O}}{C_{In}} \times 100$
-60 à -40	0,33	1,9	0,39	2,0	0,23	4,3	1,63	2,6	1,47	2,3	1,33	4,7
-40 -20	0,29	2,2	0,41	2,3	0,22	4,4	1,62	3,1	1,65	2,6	1,39	6,5
-20 0	0,29	2,4	0,41	2,0	0,23	4,5	1,59	3,4	1,43	2,4	1,42	5,6
0 20	0,32	2,2	0,41	2,8	0,22	4,8	1,25	2,8	1,32	2,2	1,37	6,1
20 40	0,40	2,4	0,63	3,4	0,56	4,9	1,19	2,3	1,06	1,0	1,13	3,9
40 60	0,42	2,5	0,75	4,2	0,67	4,6	1,10	1,7	1,00	0,0	1,05	1,8
60 80	0,41	2,6	0,79	2,9	0,69	4,2	1,02	0,4	1,01	0,3	1,15	4,3
80 100	0,39	3,0	0,66	3,4	0,51	5,0	1,06	1,4	1,03	0,3	1,16	3,9
100 120	0,39	2,4	0,42	3,8	0,37	4,0	1,11	2,0	1,04	0,7	1,28	5,2

Exp. N° 10 : Chien mâle 16 kg - Perfusion de solution de glucose à 30 g/l à la vitesse de 5 ml/minute
Exp. N° 15 : Chien femelle 16 kg - Perfusion de solution de NaCl 0,1 M (5,85 g/l) à la vitesse de 5 ml/minute
Exp. N° 17 : Chien femelle 17 kg - Perfusion de solution de NaCl 0,1 M (5,85 g/l) à la vitesse de 7 ml/minute

Exp. N° 11 : Chien femelle 13 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 5 ml/minute
Exp. N° 13 : Chien mâle 13 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 5 ml/minute
Exp. N° 18 : Chien mâle 14 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 7 ml/minute

L'excrétion du chlore dépasse généralement celle du sodium. En diurèse aqueuse, 16,3 % de l'eau et 10,4 % du sodium filtrés sont excrétés lorsque l'action est maximale; en diurèse saline hypertonique, ces pourcentages sont respectivement de 35,9 % et de 37,5 %.

B. Action sur les clearances de l'inuline et du P.A.H..

La clearance de l'inuline augmente légèrement au début de l'action puis elle décroît ensuite; ses variations restent cependant de faible amplitude. La clearance du P.A.H. diminue de façon marquée.

C. Action sur l'osmolarité et la clearance osmolaire.

Dans tous les cas la clearance osmolaire est augmentée. Les rapports des osmolarités de l'urine et du plasma augmentent en diurèse aqueuse et diminuent en diurèse saline hypertonique; dans tous les cas l'osmolarité de l'urine tend à se rapprocher de celle du plasma.

D. Action sur la clearance et la réabsorption de l'eau libre.

Dans les expériences réalisées en diurèse aqueuse, alors que la clearance de l'eau libre rapportée à 100 ml de filtrat glomérulaire par minute durant la phase de contrôle est de l'ordre de 3 ml/mn, cette valeur augmente légèrement sous l'effet du T.S.S.. Nous n'avons observé de diminution qu'une seule fois (Expérience N° 12), alors qu'elle atteignait 9 ml/mn durant la phase de contrôle.

Dans les expériences réalisées en diurèse saline hypertonique, la réabsorption de l'eau libre (TC_{H2O}) diminue constammemt et peut même dans certains cas s'annuler lorsque l'action du produit est maximale.

4. DISCUSSION.

Les faibles variations de la clearance de l'inuline montrent que l'action du T.S.S. ne modifie pas de façon marquée le débit de filtration glomérulaire. Ce résultat confirme les observations antérieures. Il s'accorde avec les résultats obtenus à partir d'autres diurétiques qui sont rapportés dans la littérature.

La diminution de la clearance du P.A.H., marquée surtout durant la phase de décroissance de l'action diurétique, ne paraît pas traduire une diminution du flux plasmatique rénal. Elle pourrait résulter d'un phénomène de compétition entre le P.A.H. et le T.S.S. au niveau du système d'excrétion des acides. Cette possibilité sera examinée ultérieurement. Des expériences de contrôle, sans perfusion de T.S.S., ont montré que cette baisse de C_{PAH} ne résultait pas de l'expansion sévère imposée aux animaux qui serait en mesure d'entraîner une augmentation de la fraction filtrée, c'est à dire une diminution du rapport C_{PAH}/C_{In}.

Le T.S.S. provoque dans tous les cas de diurèse saline hypertonique une diminution de la réabsorption de l'eau libre, en même temps qu'une augmentation du débit urinaire et de la clearance osmolaire. Il est donc censé agir au niveau du segment de dilution médullaire.

La diminution de la clearance de l'eau libre, qui devrait théoriquement apparaître en pareil cas, n'a été observée qu'une seule fois (Exp. N° 12). D'après les conclusions de SUKI et coll. (1965), de SELDIN et coll. (1966), ces résultats ne sauraient constituer un argument contre notre hypothèse. Ils peuvent en effet résulter d'une action proximale dont la vraisemblance est accréditée par les pourcentages maximaux du volume filtré qui est excrété (16,3 % en diurèse aqueuse et 35,9 % en diurèse saline hypertonique); cette possibilité ressort également du calcul théorique du pourcentage du sodium filtré qui est apporté à l'anse $(C_{H2O} + C_{Na})100/C_{In})$ (MOREL et de ROUFFIGNAC 1973). Ces résultats peuvent encore s'expliquer, selon SUKI et coll. (1965), à partir des conditions initiales de la diurèse. Ces auteurs ont en effet montré que, sous l'action du furosémide, la clearance de l'eau libre chez le chien perfusé pouvait augmenter, rester inchangée ou diminuer selon que sa valeur durant la phase de contrôle était inférieure, égale ou supérieure à 8 ml/minute, suivant leur protocole expérimental. Cette particularité découle des considérations suivantes :
- la capacité de formation de l'eau libre par le segment de dilution ne peut être jamais totalement abolie,
- de l'eau libre peut être perdue dans le tube collecteur, même en diurèse aqueuse.

Pour mettre en évidence plus sûrement une action inhibitrice du T.S.S. sur la réabsorption ionique dans la branche ascendante, nous avons choisi de représenter nos résultats dans le système de coordonnées utilisé par SELDIN et coll. (1966).

Selon ces auteurs, au cours de la diurèse aqueuse en l'absence d'un diurétique, la réabsorption du sodium dans la branche ascendante (représentée approximativement par $\frac{C_{H2O}}{C_{In}} \times 100$) est sensiblement proportionnelle au volume de filtrat que reçoit ce segment (représenté par $\frac{V}{C_{In}} \times 100$). L'action d'un diurétique à ce niveau se traduit donc par une diminution de la clearance de l'eau libre pour un même volume excrété.

Au cours de la diurèse saline, l'action d'un diurétique inhibant la réabsorption du sodium dans la branche ascendante se traduit, par rapport aux valeurs témoins, par une diminution de TC_{H2O} pour une même valeur de la clearance osmolaire.

Sur les graphiques suivants (Figures IV. 1., IV. 2. et IV. 3.), nous avons porté, pour chaque type de diurèse, les valeurs témoins ainsi que les valeurs observées à partir de trois animaux au cours de l'action diurétique maximale, c'est à dire entre 20 et 100 minutes après le début de l'administration du produit. Il importe de noter que notre protocole expérimental est légèrement différent de celui qui a été appliqué par SELDIN et coll. (1966).

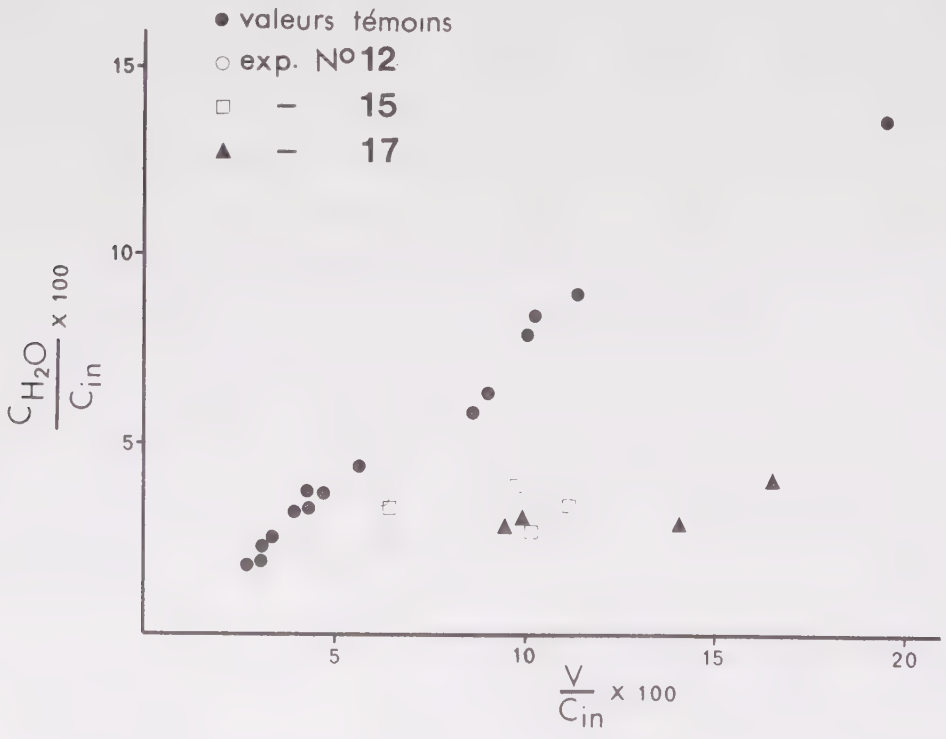


Fig. IV. 1. - *Diminution de C_{H2O} (exprimée en % du filtrat glomérulaire) pour différentes valeurs du volume excrété (exprimé en % du filtrat glomérulaire), sous l'effet du T.S.S. en diurèse aqueuse.*

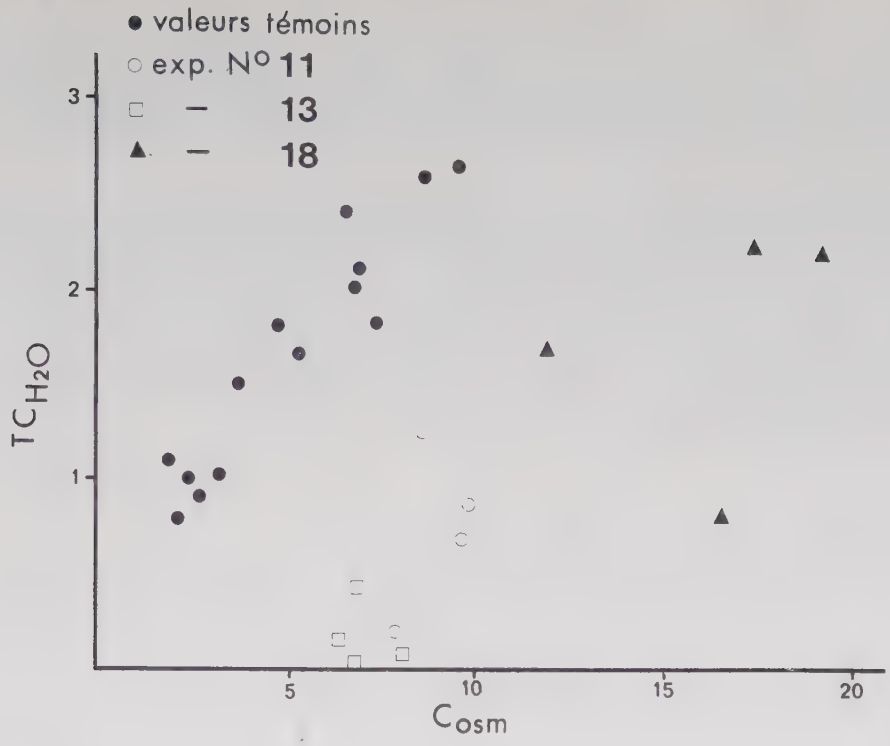


Fig. IV. 2. - *Diminution de TC_{H2O} pour différentes valeurs de la clearance osmolaire, sous l'effet du T.S.S. en diurèse saline hypertonique.*

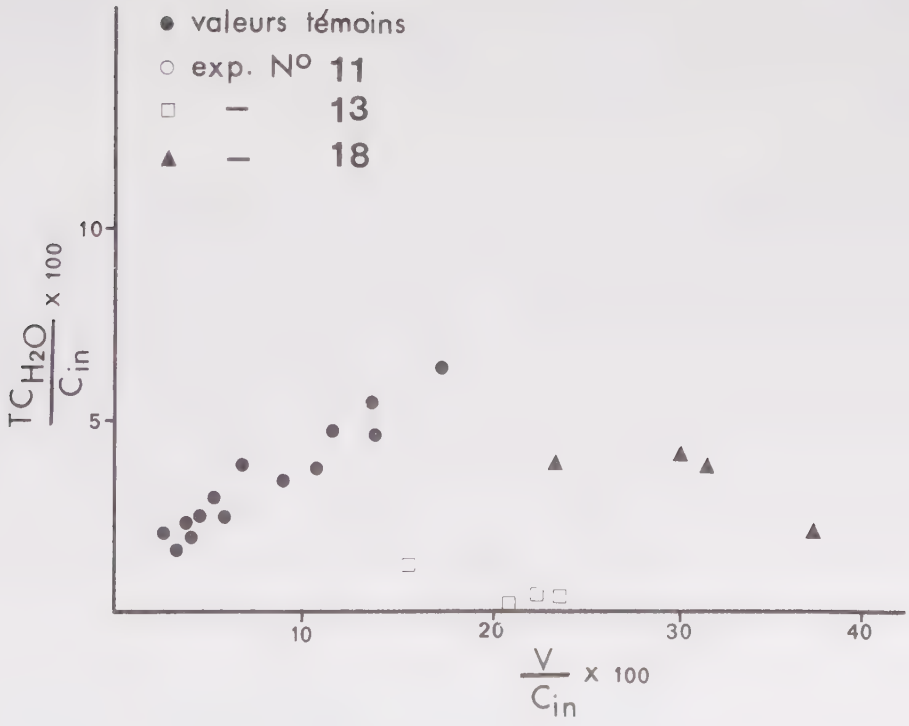


Fig. IV. 3. - *Diminution de TC_{H2O} (exprimée en % du filtrat glomérulaire) pour différentes valeurs du volume excrété (exprimé en % du filtrat glomérulaire), sous l'effet du T.S.S. en diurèse saline hypertonique.*

Avec les deux types de diurèse, nous observons une diminution, par rapport aux valeurs témoins, des grandeurs figurant en ordonnée.

Il est donc permis de penser que le T.S.S. exerce une action inhibitrice sur la réabsorption ionique au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE. Il n'est pas exclu qu'une action plus discrète se produise en outre au niveau du tubule proximal, comme c'est le cas avec le furosémide (BRENNER et coll. 1969).

Si l'on compare l'ensemble des résultats fournis par le T.S.S. à ceux qui ont été rapportés par CAPPS et coll. (1952), WESSON et ANSLOW (1952), GOLDSTEIN et coll. (1961) pour les dérivés mercuriels, par GOLDBERG, Mc CURDY et coll. (1964), SUKI et coll. (1965), GOLDBERG (1966), LARAGH et coll. (1966) à partir du furosémide et de l'acide éthacrynique, on peut constater que les effets du T.S.S. sont qualitativement voisins de ceux de ces produits; ils sont quantitativement moins importants pour des doses pondérales identiques.

Si l'on tient compte du fait que les mercuriels sont peu actifs et relativement toxiques chez le rat et que l'acide éthacrynique n'exerce d'effets chez cette espèce que lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, il faut considérer que le mécanisme intime de l'action du T.S.S. s'apparente principalement à celui du furosémide.

Si, comme nous l'avons déjà souligné, une augmentation de la clearance de l'eau libre ne peut servir d'argument à l'encontre de notre hypothèse sur le lieu d'action du T.S.S., elle peut par ailleurs traduire une absence d'action au niveau du segment de dilution cortical et de la partie terminale du néphron. En effet, une diminution de C_{H2O} résultant d'une rétention saline dans l'anse de HENLE peut être compensée par une augmentation de la production d'eau libre dans les parties distales, dans la mesure où leur faculté de réabsorber le sodium est peu ou pas affectée.

Nous pensons, à la suite de ces observations, que l'action distale du T.S.S. est moins marquée que celle du furosémide, et que c'est en cela principalement que se différencient ces deux diurétiques.

III. ETUDE DU GRADIENT CORTICO-PAPILLAIRE.

Si le T.S.S. inhibe la réabsorption ionique au niveau du segment de dilution médullaire, comme semblent l'indiquer les résultats fournis par la méthode des clearances, il doit entraîner parallèlement la diminution ou même la disparition du gradient osmotique cortico-papillaire. C'est pourquoi nous avons cherché à confirmer l'hypothèse actuelle par une étude des modifications du gradient de concentration en sodium sous l'action du T.S.S..

1. CHOIX D'UNE METHODE.

L'existence du gradient osmotique intra-rénal a été démontrée par WIRZ, HARGITAY et KUHN (1951) à partir d'études cryoscopiques de coupes de reins de rats. Leurs observations ont été confirmées par ULLRICH et coll. (1955) par immersion de coupes de reins dans des solutions de tonicités différentes.

ULLRICH et JARAUSCH (1956) ont montré que l'augmentation de l'osmolarité tissulaire, de la zone corticale à la papille, était principalement due à l'accroissement des concentrations en sodium, en chlore et en urée.

Parmi les nombreux travaux consacrés à l'étude des gradients cortico-papillaires et de leurs variations sous différentes actions, nous devons citer ceux de GOLDBERG et coll. (1964), de HELLER et VOSTAL (1967), d'ATHERTON et coll. (1971) sur l'effet des perfusions de solutés, ceux de BAER et coll. (1962) montrant que le gradient n'est pas modifié sous l'action de l'hydrochlorthiazide, ceux de HOOK et WILLIAMSON (1965 c) mettant en évidence son abolition sous l'effet du furosémide, ceux de BEYER et coll. (1965) sur les actions de l'acide éthacrynique et du méralluride, ceux de GOLDBERG et coll. (1964, 1966) se rapportant aux effets de l'acide éthacrynique, de l'hydrochlorothiazide et de la mercaptomérine. Ces auteurs ont eu recours à l'analyse de fragments de parenchyme rénal prélevés à différents niveaux.

Bien que les radioéléments soient d'un usage courant dans les recherches actuelles de physiologie et de pharmocologie rénales,

peu d'auteurs ont fait appel aux méthodes autoradiographiques pour l'étude des gradients de concentration cortico-papillaires. KRAKUSIN et JENNINGS (1957) ont décrit une méthode de mise en évidence du gradient de concentration du sodium par autoradiographie de coupes de reins de rats au moyen du ^{22}Na. Leurs essais avec l'acétazolamide et le méralluride n'ont pas révélé de modifications importantes du gradient sous l'action de ces diurétiques.

GUINNEBAULT (1964) a déterminé par autoradiographie les répartitions de l'eau, du sodium et du potassium dans le rein de lapin.

A la suite de ces travaux, nous avons pensé que l'étude autoradiographique des modifications du gradient sous l'action d'un diurétique était susceptible de nous fournir des renseignements intéressants sur le mécanisme et le lieu d'action de ce produit. Pour estimer la valeur de la technique macroautoradiographique choisie, nous avons pratiqué une étude parallèle au moyen des méthodes chimiques classiques .

2. BASES ANATOMIQUES.

Les études des gradients ont été pratiquées sur le rein de rat. On distingue dans le parenchyme rénal de cet animal quatre zones différenciées anatomiquement et physiologiquement, qui sont représentées dans la figure suivante (Figure IV. 4.).

La zone 1, appelée cortex ou zone corticale, contient les glomérules, les portions contournées des tubules proximaux, les tubules distaux et les débuts des tubes collecteurs. Elle est richement vascularisée.

Les zones 2, 3 et 4 constituent la medulla ou zone médullaire.

La zone 2 est la partie extérieure de la zone médullaire externe. Elle renferme surtout les portions rectilignes des tubules proximauxavec des segments d'anses de HENLE et des parties de tubes collecteurs. Sa vascularisation est faible.

La zone 3 constitue la partie intérieure de la zone médullaire externe. On y rencontre principalement des branches ascendantes et descendantes de l'anse de HENLE et des tubes collecteurs. Les vasa recta y sont particulièrement abondants.

La zone 4 est la medulla interne ou zone médullaire interne. elle renferme des extrêmités minces d'anses de HENLE et des gros tubes collecteurs. Elle n'est que peu vascularisée. Son extrêmité représente la papille.

Le segment de dilution, tel qu'il a été défini par SELDIN et coll. (1966), se situe dans la zone 1 pour sa partie corticale et dans les zones 2 et 3 pour sa partie médullaire.

3. ETUDE PAR LA METHODE AUTORADIOGRAPHIQUE.

Cette étude a fait l'objet d'une communication préliminaire (DARTIGUES, LAPARRA et coll. 1972).

A. Technique.

Le sodium étant le principal élément participant à l'élaboration du gradient cortico-papillaire, nous avons choisi pour réaliser cette étude le radioisotope ^{22}Na.

L'expérimentation a été réalisée sur des rats blancs wistar de poids moyen 200 g. Les animaux ont été privés de nourriture et de boisson 36 heures avant le début de l'expérience, de manière à se trouver en état d'hydropénie et à présenter un gradient très développé.

Tous les animaux reçoivent au début de l'expérience, par voie intrapéritonéale, 5 ml d'une solution hypertonique de chlorure de sodium à 30 g/l contenant 10 microcuries de ^{22}Na sous forme de NaCl et éventuellement les produits essayés. Ce volume permet l'administration en solution d'une quantité suffisante d'un produit relativement peu soluble comme le T.S.S.. L'emploi d'un liquide hypertonique évite une réhydratation trop importante qui pourrait entraîner une atténuation du gradient préexistant.

Pour estimer la valeur de la méthode, nous utilisons, parallèlement avec le T.S.S., des produits tels que l'acétazolamide, l'hydrochlorothiazide et le furosémide dont le mécanisme et le lieu d'action sont suffisamment bien connus.

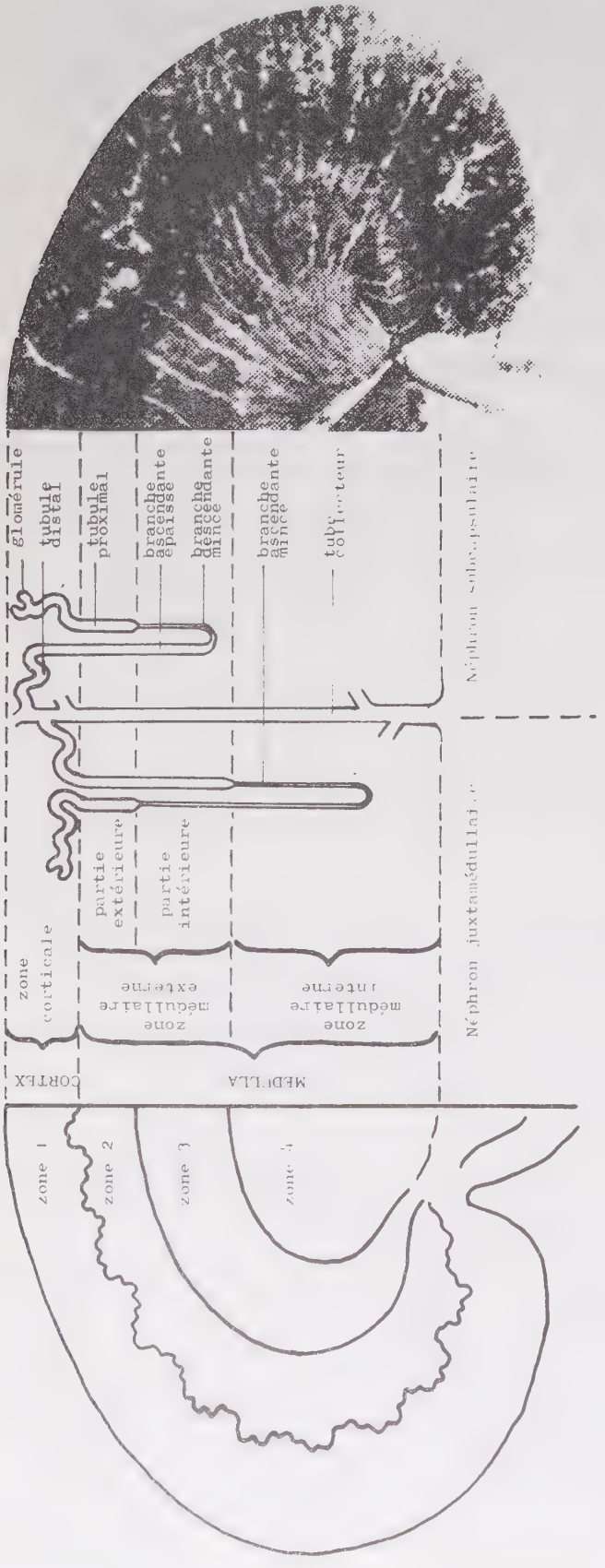


Fig. IV. 4. - *Structure anatomique du rein de rat.*

Les produits actifs sont administrés aux animaux traités à la dose de 100 mg/kg de manière à exercer des effets submaximaux.

Les composés solubles (acétazolamide, furosémide, T.S.S.) ont été administrés par voie intrapéritonéale, en solution dans le liquide de surcharge hypertonique; l'hydrochlorothiazide a été donné per os en suspension dans 2 ml de sirop simple.

Trente minutes après ce traitement, les animaux sont anesthésiés à l'éther. Les reins sont découverts par une large incision abdominale. Ils sont ensuite clampés au moyen d'une pince de KOCHER, puis excisés et placés dans le mélange réfrigérant acétone-neige carbonique. Ces opérations doivent être menées très rapidement pour minimiser les effets de diffusion des solutés.

Les reins congelés sont ensuite conservés au congélateur à -30 °C pendant 24 heures. Après ce délai, on effectue des coupes au microtome à congélation. Ces coupes sont recueillies sur des bandes collantes (Blenderm-Surgical-tape) et placées immédiatement au congélateur à -30 °C. Cette température provoque en trois ou quatre jours la deshydratation des coupes que l'on peut alors ramener à la température ambiante. Chaque coupe numérotée est appliquée, en chambre noire, sur un film Kodirex. Les films, mis sous presse pour favoriser le contact, sont placés au réfrigérateur.

Après 48 heures de contact, les coupes sont séparées du film qui est alors développé suivant les techniques classiques puis tiré sur papier. Sur les clichés obtenus, les plages claires correspondent aux parties du film qui ont été impressionnées, donc aux zones de localisation du radioisotope dans les coupes. Ces plages sont d'autant plus claires que la concentration en sodium y est plus importante.

Afin de connaître les possibilités d'artefacts, les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant du chlorure de sodium non marqué. Aucune impression des films n'a été décelée. Ni les diurétiques employés, ni les constituants du parenchyme rénal ne peuvent donc produire d'artefact.

B. Résultats.

Les résultats s'expriment par les clichés représentés sur la Planche I. Ils figurent la répartition du radiosodium dans des coupes de reins d'un animal témoin et d'animaux ayant reçu respectivement de l'acétazolamide, de l'hydrochlorothiazide, du furosémide et du T.S.S..

C. Discussion.

Sur la coupe de rein d'animal témoin, le gradient de sodium est parfaitement visualisé. On peut observer cependant un arc légèrement plus sombre à la limite des zones 3 et 4 qui traduit une certaine diminution de la concentration sodique à ce niveau.

Sous l'effet de l'acétazolamide, le gradient présente le même aspect que chez l'animal témoin. Ce résultat s'accorde avec celui qui a été observé par KRAKUSIN et JENNINGS (1957); il est compatible avec la théorie selon laquelle ce produit n'exercerait aucune action sur la réabsorption du sodium dans la partie médullaire.

Les modifications sous l'action de l'hydrochlorothiazide sont négligeables. Ce résultat confirme celui qui a été établi par BAER et coll. (1962). Il s'accorde avec le fait que ce produit inhibe la réabsorption du sodium dans la partie corticale du segment de dilution.

Sous l'action du furosémide, l'atténuation des contrastes traduit l'abolition du gradient, tandis que l'assombrissement du cliché indique une diminution de la teneur en sodium consécutive à l'importante diurèse. Ce résultat est en accord avec les données fournies par HOOK et WILLIAMSON (1965 c) et les théories actuelles qui attribuent au furosémide la propriété d'inhiber la réabsorption du sodium sur toute la longueur du néphron.

Les effets du T.S.S. s'apparentent à ceux du furosémide. Il apparaît cependant que la concentration en sodium se trouve augmentée dans la zone corticale. Un tel résultat est, à première vue, surprenant et difficilement interprétable à la lumière des connaissances actuelles. Nous avons cherché à le vérifier en recourant aux méthodes d'analyse physico-chimiques.

PLANCHE I

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE REINS DE RATS AYANT RECU DU ^{22}Na

sacrifiés 30 minutes après administration de diurétiques

Fig 1 : COUPE DE REIN DE RAT TEMOIN

Le gradient de sodium est parfaitement visualisé. On observe des concentrations en sodium élevées au niveau de la zone médullaire externe ainsi qu'au niveau de la papille.

Fig 2 : COUPE DE REIN DE RAT AYANT RECU DE L'ACETAZOLAMIDE

Le gradient de sodium présente sensiblement le même aspect que sur le rein d'animal témoin.

Fig 3 : COUPE DE REIN DE RAT AYANT RECU DE L'HYDROCHLOROTHIAZIDE

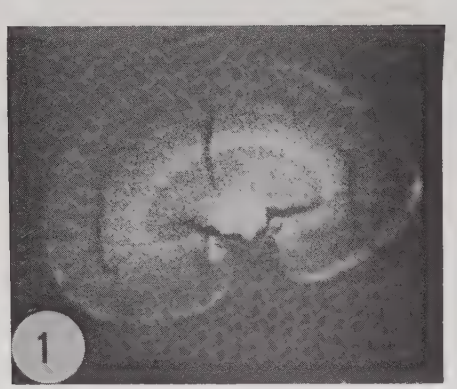
L'aspect du gradient n'est guère modifié

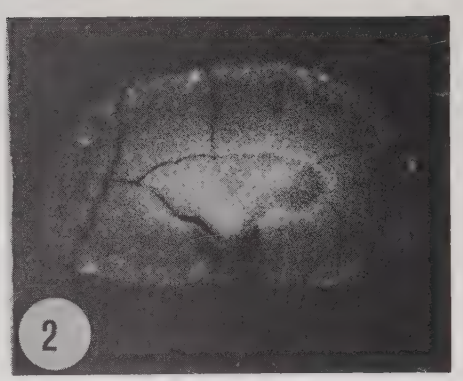
Fig 4 : COUPE DE REIN DE RAT AYANT RECU DU FUROSEMIDE

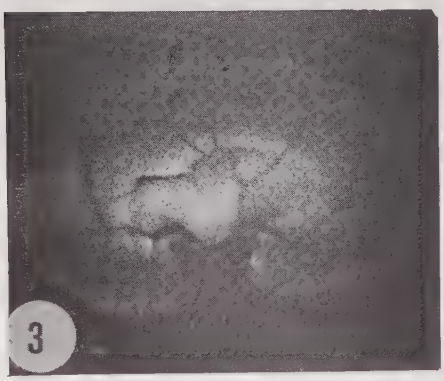
Le gradient de sodium est pratiquement aboli. Il semble cependant que la zone corticale soit plus claire.

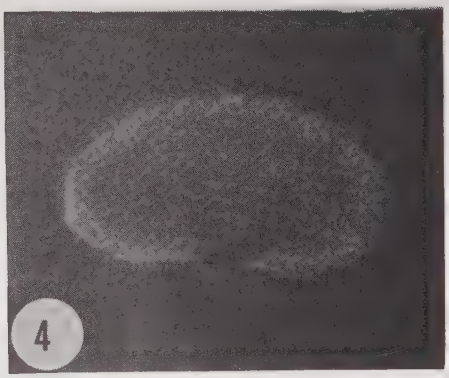
Fig 5 : COUPE DE REIN DE RAT AYANT RECU DU T.S.S.

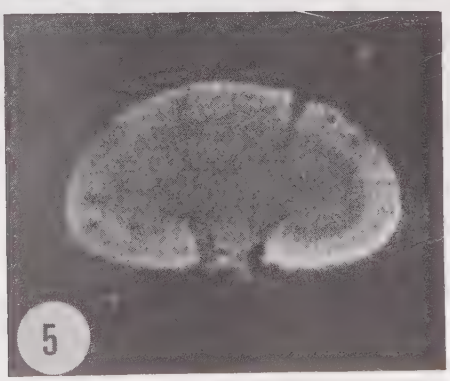
Le gradient de sodium semble inversé à première vue. L'aspect est comparable à celui du rein de rat ayant reçu du furosémide, mais les contrastes paraissent plus accentués. La concentration en sodium est apparemment augmentée dans la zone corticale.


1


2


3


4


5

4. ETUDE PAR METHODE PHYSICO-CHIMIQUE SUR REIN CONGELE.

A. Technique.

Les expériences ont été faites sur des reins de rats prélevés au cours des essais précédents sur des animaux témoins et des animaux ayant reçu du T.S.S...

Après un séjour de 24 heures au congélateur à -30 °C, les reins sont traités suivant la méthode décrite par HELLER et VOSTAL (1967). Une coupe longitudinale de 1,5 à 2 mm d'épaisseur est isolée dans la partie centrale de chaque rein. Sur une section de cette coupe, on sépare les échantillons correspondant au cortex (C), à la medulla externe (ME), à la medulla interne (MI) et à la papille (P). Ce découpage s'effectue comme l'indique le schéma suivant (Fig. IV. 5.). L'opération doit être conduite rapidement avant la décongélation de la coupe.

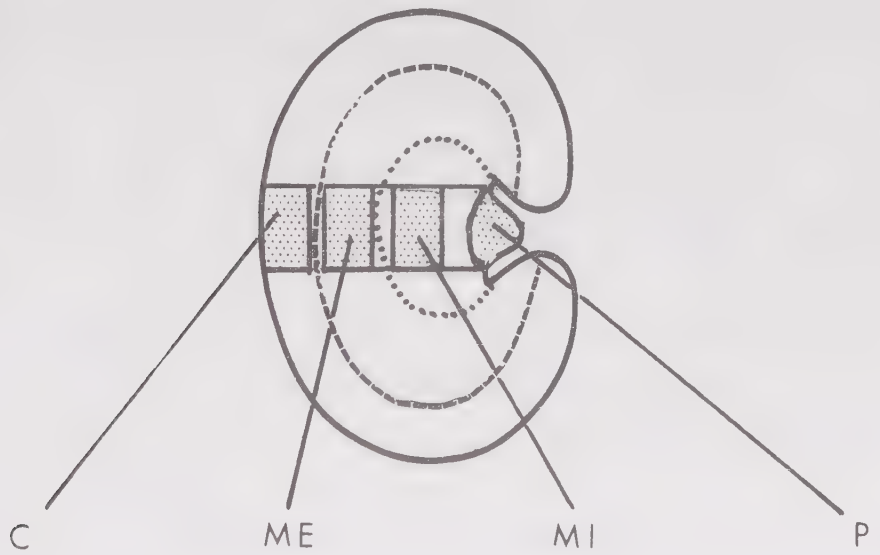


Fig. IV. 5. - *Schema indiquant la méthode de découpage du rein.*
C = Cortex
ME = Medulla externe
MI = Medulla interne
P = Papille

Les prélèvements sont placés dans des tubes tarés munis de bouchons rodés, puis ils sont pesés. On introduit ensuite dans chaque tube 4 ml d'acide sulfurique N et on élue pendant cinq jours. Le sodium, et éventuellement le potassium, sont dosés dans l'éluat par photométrie de flamme.

B. Résultats.

Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant (tableau IV. 5.).

Ils montrent que l'action du T.S.S. semble contribuer à maintenir dans le cortex une concentration sodique plus élevée que dans les zones plus profondes du rein. Chez les animaux traités, la concentration sodique corticale paraît même plus élevée que chez les témoins. Dans les autres zones, par contre, la concentration sodique est très abaissée chez les animaux ayant reçu du T.S.S..

Ces résultats semblent donc confirmer ceux qui ont été fournis par la technique autoradiographique.

Nous devons noter que les concentrations en potassium paraissent, par ailleurs, peu modifiées par rapport aux témoins.

Pour éliminer toute cause d'erreur liée aux conditions de congélation, nous avons repris ces expériences en opérant les dosages sur des fragments de reins frais.

5. ETUDE PAR METHODES PHYSICO-CHIMIQUES SUR REIN FRAIS.

A. Technique.

Les expériences ont été pratiquées sur des rats ayant reçu par voie intrapéritonéale différentes surcharges liquides, comme il est indiqué dans le tableau rapportant les résultats (tableau IV. 6.), de manière à pouvoir estimer les effets du T.S.S. dans différents états de tonicité.

Tableau IV. 5.

Concentrations du sodium et du potassium dans les reins de rats après congélation.

Tous les animaux, en état d'hydropénie, ont reçu 5 ml de solution de NaCl à 3 % par voie intrapéritonéale. Les animaux traités ont reçu, en outre, 100 mg/kg de T.S.S..

Les concentrations sont exprimées en mg/kg de tissu rénal à l'état congelé.

	Na mEq/kg						K mEq/kg		
	Témoins		Traités T.S.S.				Témoin	Traité T.S.S.	
rat N°	1	2	3	4	5	6	2	5	6
cortex	96,2	106,9	126,5	117,4	138,2	101,0	75,3	83,1	71,3
medulla externe	115,0	119,3	106,4	89,1	73,0	59,9	65,5	52,6	48,6
medulla interne	132,8	137,0	116,2	103,8	69,1	58,1	57,8	46,8	43,4
papille	173,0	178,2	120,0	110,0	69,2	71,4	61,9	30,5	56,3

Chaque donnée numérique exprime un seul résultat.

Le T.S.S. a été administré en solution dans la surcharge.

Les animaux ont été sacrifiés une heure après le traitement. Les reins ont été immédiatement prélevés et découpés, puis les échantillons ont été traités à l'état frais suivant la méthode précédemment décrite.

L'urée a été dosée par voie automatique suivant la méthode colorimétrique à la diacétylmonoxime. L'osmolarité a été calculée approximativement à partir des taux de sodium, de potassium et d'urée, suivant la formule : osm. = 2 (Na + K) + urée

B. Résultats.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant (tableau IV. 6.).

Ils font apparaître, dans tous les cas, une abolition des gradients d'osmolarité et d'urée sous l'action du T.S.S..

En ce qui concerne les variations du gradient de sodium, les anomalies observées au cours des études sur les reins congelés paraissent inconstantes et moins marquées dans cette dernière série d'expériences.

C. Discussion.

Il ne semble pas que l'on doive attacher une importance particulière au caractère des modifications du gradient de sodium observées sur les reins congelés sous l'action du T.S.S.. En effet, les expériences réalisées à partir de fragments de rein frais ne confirment pas de manière significative les résultats obtenus à partir des organes congelés; elles révèlent, en premier lieu une action dans le sens de l'abolition du gradient de sodium.

Par ailleurs, une rétention préférentielle de sodium dans la zone corticale, sous l'effet d'un diurétique, est difficilement concevable, quelles que soient les modalités d'action présumées de ce produit.

Tableau IV. 6.

Variations du gradient cortico-médullaire sous l'action du T.S.S..

(Dosages pratiqués sur parenchyme rénal de rat frais, non congelé)

Les conditions de traitement des animaux sont indiquées dans la première colonne du tableau.

animaux	zone	Na mEq/kg	K mEq/kg	Urée mmol/kg	Osmolarité mosm/kg
	Hypotonie				
Témoin (5 ml eau distillée/100 g)	C	51,7	62,0	17,2	244,6
	ME	81,5	52,1	27,1	294,3
	MI	100,8	42,2	68,6	354,6
Traité (5 ml eau dist. + 10 mg T.S.S./100g)	C	64,7	44,0	17,5	234,9
	ME	52,8	58,0	22,8	244,4
	MI	76,5	45,7	32,8	277,2
	Isotonie				
Témoin (2,5 ml soluté physiol./100g)	C	56,5	64,1	26,6	267,8
	ME	80,1	63,9	81,3	369,3
	MI	130,0	55,2	125,5	495,9
Traité (2,5 ml sol. phys. +10mg T.S.S./100g)	C	60,8	60,8	33,7	276,9
	ME	64,2	57,3	47,7	290,7
	MI	68,4	50,1	40,1	277,1
	Hypertonie				
Témoin (2,5 ml sol. NaCl à 30%/100 g)	C	79,1	73,3	38,2	343,0
	ME	109,8	61,9	77,2	420,6
	MI	152,3	59,9	137,1	561,5
Traité (2,5 ml sol. NaCl 30% + 10 mg T.S.S. /100 g de rat)	C	73,1	51,0	33,8	282,0
	ME	72,9	48,8	39,0	282,4
	MI	84,0	48,4	48,8	313,6

C : cortex ME : medulla externe MI : medulla interne

Il n'est pas exclu que l'effet de rétention (ou d'accumulation) du sodium dans la zone corticale des reins d'animaux traités, observé sur les organes ayant subi la congélation, soit en réalité un artefact introduit par les conditions expérimentales.

Nous devons retenir en premier lieu, de cette série d'expériences, que le T.S.S. agit dans le sens d'une abolition du gradient osmotique cortico-papillaire.

La disparition de ce gradient, sous l'action du T.S.S., doit être envisagée comme la conséquence de l'inhibition de son mécanisme d'entretien, c'est à dire de la suppression (ou tout au moins de la diminution) de la réabsorption du sodium dans la partie médullaire de la branche ascendante de l'anse de HENLE.

Des effets comparables ont été observés à partir du furosémide (HOOK et WILLIAMSON 1965 c), à partir de l'acide éthacrynique et de certains dérivés mercuriels (BEYER et coll. 1965, GOLDBERG et coll. 1964).

IV. CONCLUSIONS.

Les résultats fournis par la méthode des clearances et par l'étude des gradients cortico-papillaires montrent que le T.S.S. inhibe la réabsorption du chlorure de sodium principalement au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE (segment de dilution médullaire), accessoirement au niveau du tubule proximal.

Cette action s'apparente plus particulièrement à celle du furosémide. Toutefois, la comparaison des résultats expérimentaux obtenus avec ces deux composés permet de considérer que les actions proximale et distale du T.S.S. sont relativement moins marquées.

Ce type d'action pourrait résulter, au moins en partie, d'une inhibition de la réabsorption active du chlorure. Selon les résultats obtenus par BURG et coll. (1973) à partir du furosémide sur le néphron de lapin, la pompe à chlore jouerait un rôle important au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE.

C H A P I T R E V

REPARTITION, METABOLISME, ELIMINATION DU T.S.S..

Après avoir précisé le lieu d'action du T.S.S. dans le néphron, nous nous proposons de rechercher les modalités de sa répartition dans l'organisme, de son métabolisme et de son élimination.

I. CHOIX DES METHODES.

La coloration du T.S.S. et ses propriétés spectrales sont des caractéristiques du groupement dithiole-thione qui permettent la caractérisation du produit et son dosage spectrophotométrique dans les milieux liquides. Ces caractéristiques se modifient lorsque le T.S.S. subit in vitro ou in vivo des transformations qui altèrent le groupement dithiole-thione.

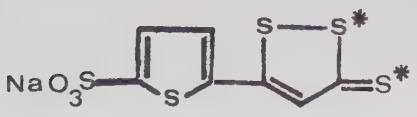
Les méthodes colorimétriques sont donc inopérantes pour caractériser ou doser le T.S.S. dans des milieux ayant subi des traitements susceptibles de modifier le produit, ou encore pour caractériser ou doser certains de ses catabolites.

Pour mener à bien notre étude, nous avons du recourir à des méthodes pouvant s'appliquer aussi bien au T.S.S. qu'à ses différents produits de transformation.

Nous avons utilisé pour cela du T.S.S. marqué dans la molécule duquel deux atomes du cycle étaient constitués par du ^{35}S. Ce radio-isotope est un émetteur β^- qui possède une période de 87 jours.

Dans un but comparatif, nous avons également pratiqué certaines expériences au moyen de O.S.S. marqué au ^{35}S au niveau du cycle.

Les produits marqués, dont les formules sont représentées ci-dessous, ont été préparés par DORANGE (1975), suivant des méthodes originales utilisant du pentasulfure de phosphore $P_4{}^{*}S_{10}$ à base de ^{35}S.



T.S.S. marqué

O.S.S. marqué

Les composés marqués obtenus possédaient, au début de l'expérimentation, les activités spécifiques suivantes :
- T.S.S. : 4,5 millicurie par millimole, soit 14,1 µCi/mg
- O.S.S. : 0,5 millicurie par millimole, soit 1,7 µCi/mg.

Dans le but de différencier le T.S.S. de ses catabolites, nous avons comparé, chaque fois que cela s'est avéré possible, les résultats fournis par les méthodes radioisotopiques et par les méthodes spectrophotométriques.

Les différentes techniques de caractérisation, de séparation et de dosage seront décrites dans les paragraphes suivants.

II. ELIMINATION DU T.S.S..

L'étude de l'élimination du T.S.S. a été poursuivie à la fois sur le plan quantitatif et sur le plan qualitatif. Nous avons défini en premier lieu la cinétique de l'excrétion du produit, puis nous avons cherché à caractériser les différentes formes d'élimination.

1. CINETIQUE DE L'ELIMINATION.

La cinétique de l'élimination a été étudiée chez le rat par des méthodes chimiques et radioisotopiques, et chez le chien uniquement par des méthodes chimiques. Parallèlement, nous avons étudié chez le rat la cinétique de l'élimination du O.S.S. marqué.

A. Techniques.

Les expériences de diurèse ont été pratiquées chez le rat et chez le chien suivant les protocoles déjà décrits. Les modalités particulières seront indiquées en même temps que les résultats.

Dans l'urine, le T.S.S. est dosé par spectrophotométrie à 430 nm en prenant comme "blanc" une dilution d'urine témoin.

Le nombre de désintégrations est compté au moyen d'un scintillateur liquide MARK I (Nuclear Chicago), en utilisant 15 ml de liquide de scintillation Diotol (toluène : 500 ml; dioxane : 500 ml; méthanol : 300 ml; naphtalène : 104 g; 2,5- diphényl oxazole P.P.O.: 6,5 g; 1,4 bis-(5-phényl 2-oxazolyl) benzène P.O.P.O.P.: 130 g). Pour chaque flacon, on effectue un comptage pendant 10 minutes et on détermine le coefficient d'efficacité par la méthode du standard externe. Les prises d'essai sont de 25 à 100 µl.

B. Résultats.

a) Expérimentation chez le rat.

- Pourcentage de la quantité de T.S.S. éliminé en six heures en fonction de la dose administrée et de la voie d'administration :

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant (tableau V. 1.).

Ils indiquent une diminution du pourcentage d'élimination à la dose de 200 mg/kg. Ce pourcentage est toujours plus faible, à dose égale, lorsque le produit est administré par voie gastrique.

- Cinétique de l'élimination urinaire du T.S.S. et du radio-isotope pour une dose de 50 mg/kg (97 µCi par rat de 200 g) :

Trois expériences ont fourni des résultats concordants. Les résultats d'une expérience sont exprimés par les figures suivantes (Figures V. 1. et V. 2.).

Tableau V. 1.

Pourcentage de l'élimination urinaire du T.S.S. par le rat pendant les six premières heures, en fonction de la dose et de la voie d'administration. (calculs à partir de six expériences)

Dose en mg/kg	Voie gastrique	Voie intrapéritonéale
25	31	42
50	33	45
100	20	46
200	12	31

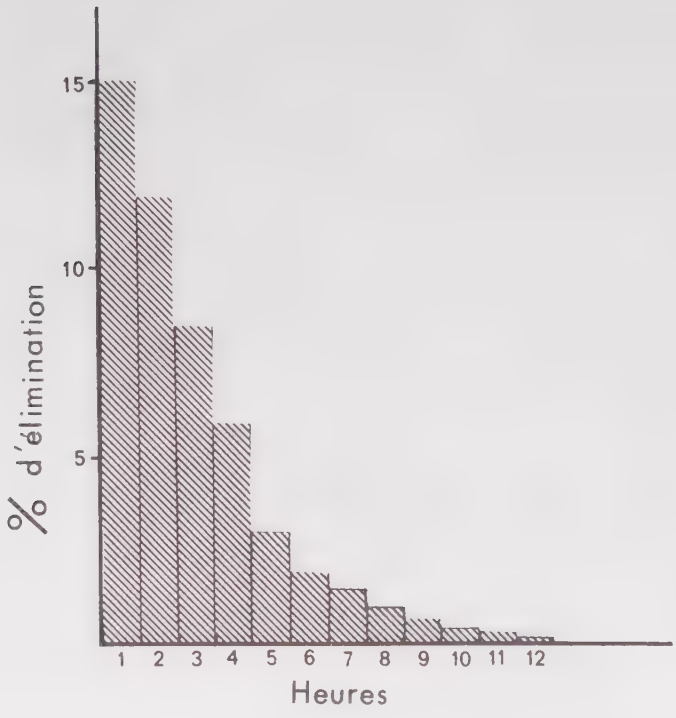


Fig. V. 1. - *Elimination urinaire du radioisotope cez le rat. Pourcentages de la dose administrée éliminés pendant chaque heure. Résultats d'une expérience. (Rat de 200 g - Dose de T.S.S. 10 mg,97 µCi par I.P.)*

Si nous comparons ces résultats à ceux qui ont été exposés au Chapitre III (Fig. III. 2. et III. 3), nous pouvons constater que la cinétique de l'élimination du T.S.S. est parallèle à celle de l'action diurétique.

Dans le cas du T.S.S., nous avons déterminé parallèlement les éliminations du produit et du radio-isotope (Fig. V. 2.).

- Cinétique de l'élimination urinaire du radio-isotope du O.S.S. pour une dose de 50 mg/kg (10 µCi pour un rat de 200 g) :

Les résultats sont exprimés par la figure suivante (Fig. V. 2.).

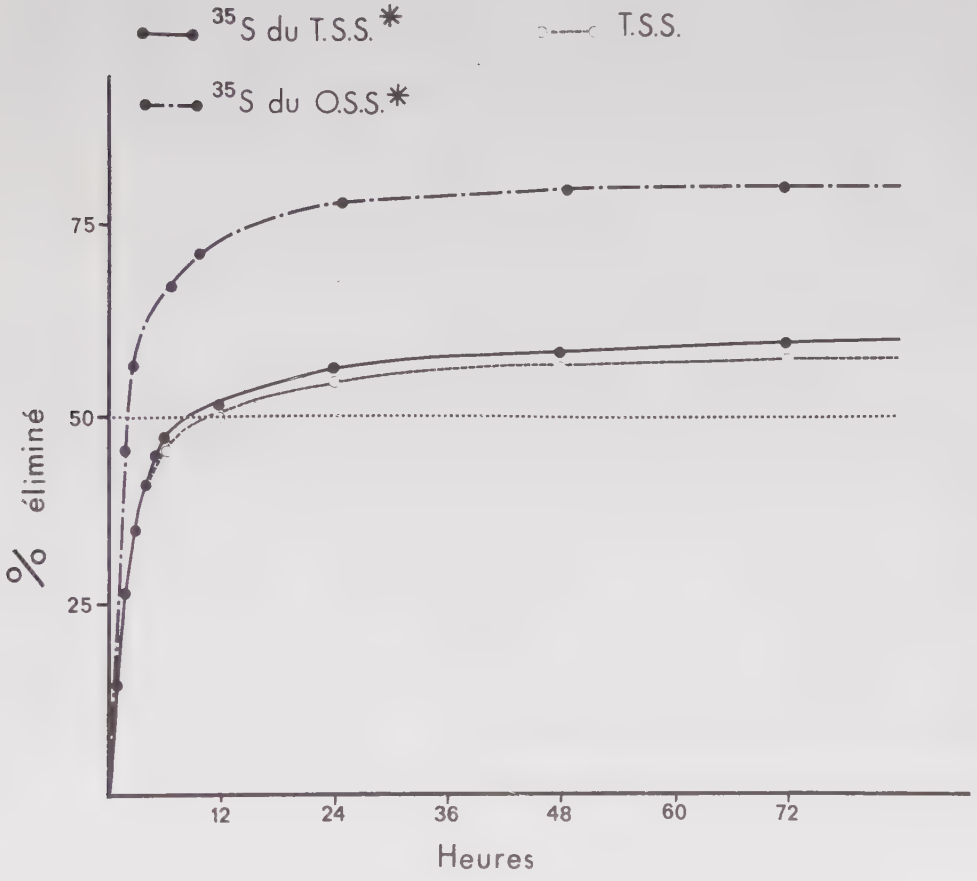


Fig. V. 2. - *Cinétique de l'excrétion urinaire du T.S.S. et du soufre marqué du T.S.S. et du O.S.S..*
(Rats de 200 g - Doses de 10 mg)

b) Expérimentation chez le chien.

Au cours des études de diurèse réalisées sur les chiens, l'élimination du T.S.S. a été systématiquement mesurée.

Dans le tableau suivant (tableau V. 2.) sont rapportées les excrétions de l'eau, du sodium et du T.S.S. au cours de trois expériences réalisées respectivement en diurèse aqueuse, en diurèse saline isotonique et en diurèse saline hypertonique.

Ces résultats montrent que la cinétique de l'élimination du T.S.S. est parallèle à celle de l'action diurétique, avec toutefois un léger retard.

Les pourcentages de produit éliminé en une heure et deux heures sont du même ordre de grandeur que chez le rat (Fig. V. 1.).

C. Discussion.

a) Expérimentation chez le rat.

L'intensité de l'excrétion urinaire des produits diminue rapidement avec le temps. Une partie des composés administrés est retenue par l'organisme.

- T.S.S. :

L'élimination urinaire du T.S.S. est surtout importante au cours de la phase d'action diurétique, ce qui constitue un argument en faveur de son action rénale directe.

Au bout de quatre heures environ, la vitesse d'excrétion diminue rapidement. La quantité de radio-isotope éliminée commence alors à dépasser celle qui correspondrait au T.S.S. excrété (dosé par spectrophotométrie), ce qui révèle l'apparition dans l'urine de catabolites soufrés provenant de la dégradation du cycle dithiole-thione.

L'expérience a été poursuivie pendant 245 heures; la quantité de radio-isotope excrétée au bout de ce temps représente 60,6 % de celle qui a été administrée.

La demi-vie biologique du T.S.S. est de l'ordre de huit heures.

Tableau V. 2.

Excrétion urinaire du T.S.S. chez le chien au cours de l'action diurétique.

Expérience N° →	15-Diurèse aqueuse			3-Diurèse saline isotonique			18-Diurèse saline hypertonique		
Temps minutes	V ml/min.	$U_{Na} \times V$ µEq/min.	$U_{TSS} \times V$ µg/min.	V ml/min.	$U_{Na} \times V$ µEq/min.	$U_{TSS} \times V$ µg/min.	V ml/min.	$U_{Na} \times V$ µEq/min.	$U_{TSS} \times V$ µg/min.
-20 à 0	3,0	83	-	2,9	62	-	6,2	998	-
Administration de T.S.S. 25 mg/kg dans le soluté de perfusion pendant l'heure suivante									
0 20	2,9	75	78	4,3	184	120	7,8	1622	218
20 40	6,7	446	724	8,5	1017	701	17,0	3230	1063
40 60	10,1	899	1485	7,8	1011	1955	15,7	2795	1319
60 80	7,2	641	1152	5,0	652	1860	15,1	2597	1246
80 100	4,0	300	688	2,8	329	1275	10,2	1846	1061
100 120	2,8	143	529	2,4	255	715	7,1	1377	675
% éliminé 1 h.			11,4			10,7			14,8
% éliminé 2 h.			23,2			31,1			31,8

Exp. N° 15 : Chien femelle 16 kg - Perfusion de solution de NaCl 0,1 M (5,85 g/l) à la vitesse de 5 ml/minute

Exp. N° 3 : Chien mâle 17 kg - Perfusion de solution de NaCl à 9 g/l à la vitesse de 3,75 ml/minute

Exp. N° 18 : Chien mâle 14 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 7 ml/minute

$U_{TSS} \times V$: Excrétion du T.S.S. en µg/minute.

Les courbes exprimant les cinétiques d'élimination du T.S.S. et du radio-isotope révèlent qu'une partie seulement du composé se trouve excrétée au cours d'une phase primaire, la majeure partie (environ 60 %) étant retenue dans l'organisme du rat pour y subir une dégradation catabolique.

Si nous comparons ces résultats à ceux qui expriment la cinétique de l'action diurétique chez le rat (Fig. III. 2. et III. 3.), nous pouvons constater que l'action diurétique s'exerce au cours de la phase précoce d'excrétion du T.S.S., et que la cinétique de la diurèse est parallèle à celle de l'élimination du produit.

- O.S.S. :

L'élimination du O.S.S. est plus rapide et plus importante que celle du T.S.S.; 45,6 % de la dose administrée est excrétée au cours de la première heure et 80,9 % après 96 heures.

La demi-vie biologique du O.S.S. est de l'ordre de deux heures.

- La différence entre les activités diurétiques du T.S.S. et du O.S.S. chez le rat est peut-être, tout au moins en partie, liée à la différence de possibilité de fixation des produits par les tissus.

Remarques :

1°) L'élimination du radio-isotope dans les matières fécales est peu importante : en 48 heures, 1,87 % pour le T.S.S. et 1,26 % pour le O.S.S..

2°) L'étude en cage à métabolisme spéciale permettant l'analyse des gaz expirés a révélé qu'aucune trace de radioactivité ne s'éliminait par voie pulmonaire.

b) Expérimentation chez le chien.

En ce qui concerne la cinétique de l'élimination du T.S.S.,

les résultats sont comparables à ceux qui ont été observés chez le rat.

2. ETUDE DES FORMES D'ELIMINATION.

Des expériences ont été pratiquées chez le rat et chez le chien. Les produits marqués n'ont été employés que chez le rat.

A. Etude chromatographique des urines de rat et de chien recueillies pendant la phase d'action diurétique.

a) Techniques.

Les rats reçoivent par voie intrapéritonéale une dose de T.S.S. de 50 mg/kg, et les chiens une dose de 25 mg/kg par voie intraveineuse.

Les urines sont recueillies pendant 1'heure suivant l'administration du produit et soumises à la chromatographie sur plaque en couche mince.

Après plusieurs essais, nous avons choisi comme support le gel de silice G selon STAHL, et comme phase mobile le butanol acétique (n butanol-acide acétique-eau : 120/30/50). Nous déposons 50 µl d'urine par spot. Nous utilisons comme témoin une solution de T.S.S. à 500 µg/ml dans du soluté de NaCl à 9 g/l (50 µl par spot). La position de chaque spot, avant et après migration, peut être facilement repérée grâce à la coloration propre du T.S.S..

Cinq expériences ont été réalisées à partir d'urines de rats et trois à partir d'urines de chiens contenant environ 100 µg de produit par millilitre.

b) Résultats.

Les différents échantillons d'urine et de solution témoin de T.S.S. ont présenté le même Rf dont la valeur moyenne est de 0,53 ± 0,06.

Remarques :

1°) Plusieurs essais de chromatographie à deux dimensions, avec différents supports et différentes phases, on été pratiqués. Aucun n'a permis de mettre en évidence de dérivé coloré du T.S.S..

2°) L'instabilité relative du T.S.S. en milieu alcalin ne permet pas l'utilisation de phases mobiles basiques.

B. Etude radiochromatographique des urines de rats recueillies pendant la phase d'action diurétique.

a) Techniques.

Les rats de 200 g reçoivent par voie intrapéritonéale, en solution dans 5 ml de soluté de NaCl à 9 g/l, soit une dose de T.S.S. marqué de 10 mg (50 mg/kg) ayant une activité de 100 µCi, soit une même dose de O.S.S. marqué ayant une activité de 15 µCi.

Les urines sont recueillies au bout d'une heure, 6 heures, 48 heures, 72 heures, 148 heures et 172 heures.

Pour des raisons d'ordre technique, nous avons choisi pour ce type d'expériences, comme support la cellulose MERCK 5716/0025 et comme phase mobile le solvant de PARTRIDGE (butanol-acide acétique-eau : 40/10/50). Les essais préliminaires ont en effet montré que ces conditions expérimentales permettaient d'éviter toute altération des produits et d'obtenir des clichés de meilleure qualité.

Les spots sont obtenus à partir de 50 µl d'urine ou de solution de produit témoin (solution administrée aux animaux).

Après développement et séchage, les plaques chromatographiques sont appliquées en chambre noire sur film KODIREX de KODAK, mises sous presse pour favoriser le contact et placées dans un réfrigérateur.

Après un temps d'exposition suffisant, les films sont séparés et développés suivant les techniques classiques.

b) Résultats.

- T.S.S. :

.Pour les urines recueillies pendant la phase d'action diurétique (0 h - 1 h et 1 h - 6 h), les spots correspondant aux échantillons d'urine et aux solutions témoins, qui sont tous visibles sur la plaque, ont subi des déplacements identiques. De légères taches brunâtres subsistent cependant aux points de départ de la migration. L'examen des clichés radiochromatographiques montre que la radioactivité se trouve localisée au niveau des différents spots et taches, qu'elle présente une intensité comparable à celle de la coloration sur la plaque, et qu'elle n'apparaît nulle part ailleurs.

Le composé qui a subi la migration et qui conserve la majeure partie de la radioactivité présente donc les mêmes caractères chromatographiques que le T.S.S. La faible partie de la radioactivité qui n'a subi aucun déplacement représente vraisemblablement des produits de transformation in vitro et in vivo du T.S.S.. A l'appui de cette thèse, nous pouvons avancer le fait que les taches observées sur la ligne de départ, sur les chromatogrammes comme sur les clichés radiochromatographiques, sont peu visibles lorsqu'elles proviennent des solutions témoins et relativement plus intenses lorsqu'elles proviennent des échantillons d'urine.

Les Rf mesurés ont pour valeur moyenne 0,72 $\pm$ 0,08 (12 exp.).

.Pour les urines recueillies entre 48 heures et 72 heures, les spots brunâtres que l'on peut observer sur la ligne de départ sont plus intenses que dans le cas précédent. Le Rf est différent de celui du T.S.S. témoin. De plus, la migration s'accompagne d'une certaine traînée. L'examen des clichés radiochromatographiques confirme en tous points ces observations.

Les Rf correspondant aux extrêmités des "traînées" ont pour valeur moyenne 0,55 $\pm$ 0,06 (12 expériences).

.Pour les urines recueillies entre 148 heures et 172 heures, les chromatogrammes révèlent que les spots, de couleur initiale brunâtre, n'ont pratiquement subi aucun déplacement. L'examen des clichés radiochromatographiques montre que le radio-isotope se retrouve, dans sa quasi-totalité, au niveau du point de dépôt de l'échantillon.

- O.S.S. :

Le O.S.S. étant peu coloré, sa présence sur les chromatogrammes ne peut être décelée visuellement. L'étude des clichés radiochromatographiques conduit à des résultats et observations comparables à ceux qui se rapportent au T.S.S..

Les Rf mesurés à partir des solutions témoin de O.S.S. et des échantillons d'urine recueillis pendant les premières phases (0 h - 1 h et 1 h - 6 h) ont pour valeur moyenne 0,73 $\pm$ 0,09 (6 expériences).

Pour les urines recueillies entre 48 heures et 72 heures, les Rf correspondant aux extrêmités des "traînées" ont pour valeur moyenne 0,55 $\pm$ 0,09.

Les Rf présentent donc des valeurs très voisines de celles qui ont été obtenues à partir du T.S.S..

C. Recherche du O.S.S. dans les urines des rats ayant reçu du T.S.S..

Le O.S.S. constitue une forme d'élimination possible du T.S.S., produite par désulfuration de la fonction thione. A ce titre, il est intéressant de pouvoir caractériser le dérivé onique dans les urines des rats ayant reçu du T.S.S..

a) Techniques.

La technique radiochromatographique précédemment employée ne permet pas de séparer les deux composés.

Nous avons pu obtenir une séparation chromatographique satisfaisante en employant comme phase mobile l'isopropanol ammoniacal (isopropanol-ammoniaque-eau : 80/10/10). Par son alcalinité, ce solvant favorise la dégradation des dérivés de la dithiole-thione; il provoque la formation de "traînées" sur les chromatogrammes et se prête mal à une étude précise. Son emploi nous a néanmoins permis de révéler de manière satisfaisante la présence simultanée du T.S.S. et du O.S.S. dans une solution.

Les échantillons d'urine recueillis au cours des expériences précédentes, ainsi que les solutions témoins de T.S.S. et de O.S.S., ont été soumis à la chromatographie utilisant l'isopropanol ammoniacal.

b) Résultats.

Les valeurs de Rf mesurées à partir de cette dernière méthode sont les suivantes (6 expériences) :

- Solutions témoins :

T.S.S.	0,69 ± 0,04
O.S.S.	0,87 ± 0,06

- Urines de rats ayant reçu du T.S.S. :

0 h à 1 h	0,68 ± 0,07
1 h à 6 h	0,68 ± 0,07
48 h à 72 h	0,48 ± 0,05

- Urines de rats ayant reçu du O.S.S. :

0 h à 1 h	0,87 ± 0,09
1 h à 6 h	0,87 ± 0,09
48 h à 72 h	0,72 ± 0,09

Cette étude n'a donc pas permis de caractériser la présence de O.S.S. dans les urines de rats ayant reçu du T.S.S.

D. Dosage du sulfate marqué dans les urines des rats ayant reçu du T.S.S..

Le fait qu'une partie plus ou moins importante de la radio-

activité urinaire ne subissait aucune migration chromatographique nous a conduit à penser que le ^{35}S du T.S.S. était susceptible de s'éliminer à l'état de composé minéral, principalement de sulfate. Nous avons donc cherché à évaluer la quantité de radioactivité urinaire qui se trouvait incluse dans cet ion.

a) Technique.

L'expérience a été pratiquée sur deux rats de 200 g ayant reçu, par voie intrapéritonéale, 10 mg de T.S.S. marqué possédant une activité de 97 µCi.

Les urines sont recueillies au bout d'une heure, 6 heures, 48 heures, 72 heures, 148 heures et 172 heures.

La radioactivité des urines est déterminée par comptage avant et après l'élimination des sulfates par précipitation au moyen du chlorure de baryum en milieu chlorhydrique. La comparaison des deux résultats permet de connaître le pourcentage de ^{35}S qui se trouvait dans l'urine à l'état de sulfate.

L'élimination des sulfates est obtenue par addition à 1 ml d'urine de 0,2 ml de HCl et de 0,2 ml de solution saturée de $BaCl_2$; le précipité est ensuite séparé par centrifugation.

b) Résultats.

Les résultats s'expriment dans le tableau suivant (tableau V. 3.).

Ils montrent que le pourcentage du soufre marqué qui s'élimine dans l'urine à l'état de sulfate augmente avec le temps, atteignant des valeurs élevées au bout de 48 heures.

Il semble donc que la fraction marquée qui ne subit aucun déplacement chromatographique soit constituée en majeure partie par des sulfates.

Tableau V. 3.

Elimination du ^{35}S à l'état de sulfate dans les urines de rats ayant reçu du T.S.S..

rats de 200 g recevant 10 mg de T.S.S. par voie intrapéritonéale (97 µCi)

temps de recueil des urines	% du ^{35}S administré qui s'élimine dans l'échantillon	% du ^{35}S qui se trouve à l'état de sulfate dans l'échantillon correspondant
0 h - 1 h	10 %	0 %
1 h - 6 h	30 %	5 %
48h - 72 h	1 %	58 %
148h - 172 h	0,5 %	75 %

(moyenne obtenue à partir de deux résultats)

E. Recherche des formes conjuguées dans l'urine.

Compte tenu de la structure du T.S.S. et de ses propriétés chimiques, il était peu probable que ce composé subisse des conjugaisons en vue de son excrétion urinaire. La présence du groupement sulfonique est suffisante pour assurer l'élimination par voie rénale du produit sans transformation préalable. L'absence dans la molécule de groupements -COOH, -OH, $-SO_2NH_2$ exclut les possibilités de conjugaison par le glycocolle, l'acide glycuronique, l'acide sulfurique et l'acide acétique, tout au moins avant l'ouverture du cycle trithié.

Par ailleurs, les résultats fournis par les études chromatographiques semblent confirmer que le T.S.S. s'élimine sous sa forme initiale pendant la phase d'action diurétique.

Au cours des premières expériences de diurèse chez le rat, nous avons évalué, dans quelques cas, les excrétion urinaires du

glycocolle, de l'acide glycuronique et des sulfates, et nous avons pu vérifier qu'elles ne subissaient aucune augmentation sous l'action du T.S.S. pendant la phase de diurèse.

F. Discussion.

A la suite des études qui viennent d'être faites, il est possible de préciser les points suivants :

- Pendant la phase d'action diurétique (0 h à 6 h), le produit est excrété dans l'urine en quantité abondante et presqu'exclusivement à l'état de T.S.S..

- L'intensité de l'élimination diminue ensuite progressivement tandis qu'apparaissent dans l'urine divers catabolites, dont du sulfate. Ultérieurement, l'élimination à l'état de sulfate devient prépondérante.

- Il apparaît donc qu'une partie du T.S.S. administré (environ 45 %) est excrétée, sans transformation, par le rein au cours des premières heures, en exerçant à ce niveau une action diurétique, tandis que l'autre partie reste fixée dans l'organisme pour y subir une dégradation catabolique aboutissant in fine à la production de sulfate.

- Il est vraisemblable que l'excrétion urinaire du T.S.S. et l'action diurétique qui en résulte se produisent lorsque la concentration du composé dans le sang circulant est suffisamment élevée.

- Il est également permis de penser que les processus et les produits de transformation du T.S.S. dans l'organisme s'intègrent dans ce qu'il est convenu d'appeler le "cycle biologique du soufre" dont le terme d'excrétion est le sulfate.

- En dépit d'une cinétique plus rapide et d'une rétention moins importante, l'élimination du O.S.S. paraît s'effectuer suivant des modalités comparables, ce produit étant lui aussi en partie excrété et en partie catabolisé.

De nombreux médicaments soufrés peuvent s'éliminer à l'état de sulfate (HIRTZ 1968).

VON GMELIN et LAGLER (1961) ont étudié l'élimination urinaire du (méthoxy-4 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3, produit cholérétique, chez l'homme, chez le rat et le lapin. Ils indiquent que ce composé s'élimine en partie dans l'urine sous forme de (hydroxy-4 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3, libre ou conjugué, mais jamais sous sa forme initiale qui est insoluble en milieu aqueux. Dans tous les cas, la quantité éliminée pendant l'expérience représente moins de 20 % de la quantité administrée. Ce dernier résultat confirme donc la possibilité de rétention par l'organisme et de catabolisation du cycle dithiole thione.

III. REPARTITION DANS L'ORGANISME DU T.S.S. MARQUE ET DE SES CATABOLITES.

Après avoir défini les modalités de l'élimination du T.S.S., nous avons entrepris de déterminer la répartition du radio-isotope dans l'organisme pendant et après la phase d'action diurétique.

Pour cela, nous avons réalisé des macroautoradiographies de coupes de souris au moyen de T.S.S., de O.S.S. et de sulfate de potassium marqués au ^{35}S, les deux derniers produits ayant été employés dans un but comparatif. Nous avons également pratiqué des comptages sur des broyats d'organes et des excreta de rats ayant reçu du T.S.S. marqué.

1. MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES DE SOURIS.

A. Technique.

La technique employée est celle de ULLBERG (1958), modifiée par COHEN et DELASSUE (1959), BLANQUET et LAPARRA (1972).

Des souris, souche Swiss, de 20 g environ, reçoivent par injection intraveineuse dans la veine caudale 5 µCi de produit marqué en solution dans 0,2 ml de soluté de NaCl à 9 g/l. Elles sont ensuite sacrifiées à des temps variables après l'administration : 30 minutes, 2 heures, 6 heures, 24 heures, 48 heures.

Au moment du sacrifice, l'animal est anesthésié à l'éther, entouré d'un corset pour qu'il conserve une forme standard, puis plongé dans un mélange acétone-neige carbonique (-80 °C). Il est ensuite conservé au congélateur à -30 °C pendant 24 heures pour que la température s'uniformise dans l'organisme.

Après avoir fixé la souris sur la plaque du microtome au moyen d'une solution de carboxyméthyl cellulose, on refroidit avec de l'anhydride carbonique sous pression. Les animaux ainsi congelés sont débités en sections parallèles au plan sagittal, de 50 µm d'épaisseur. Les coupes sont fixées sur des bandes collantes et mises immédiatement au congélateur à -30 °C pour éviter la lyse des organes.

Aprés deshydratation des coupes à -30 °C pendant trois à cinq jours, on les ramène progressivement à la température ambiante. Chaque coupe est numérotée et appliquée en chambre noire sur film KODIREX de KODAK. Ces films sont mis sous presse pour favoriser le contact et placés dans un réfrigérateur.

Lorsqu'un temps d'exposition suffisant s'est écoulé, les coupes sont séparées et les films sont développés et fixés suivant les techniques classiques. A partir des films, il est possible d'obtenir des clichés sur papier où les zones impressionnées apparaissent en clair et sont d'autant plus claires que la radioactivité est plus intense.

Des autoradiographies ont été réalisées à partir de T.S.S. marqué (30 minutes, 2 heures, 6 heures, 24 heures, 48 heures), à partir de O.S.S. marqué (30 minutes, 24 heures), à partir de sulfate de potassium marqué (24 heures). Deux souris ont été utilisées dans chaque cas.

B. Résultats.

Les résultats s'expriment par les clichés représentés sur les Planches II, III, IV et V.

- T.S.S. marqué :

.Au temps 30 minutes, une radioactivité importante s'observe au niveau du rein, de la vessie, du foie et du tractus intestinal. Le radio-isotope se localise également dans le péricarde, la cavité cardiaque, le poumon, le derme et la rate. Un début de marquage des disques intervertébraux peut être décelé. Il importe de noter l'absence de radioactivité dans le système nerveux central, dans les masses graisseuses, dans les muscles et dans l'estomac.

.Au temps 2 heures, la radioactivité reste aussi importante dans le rein, le foie, la vessie et l'intestin. Elle est également très marquée au niveau de la vésicule biliaire. Elle paraît augmenter dans le derme et l'épiderme. Le marquage des disques intervertébraux s'accentue, tandis que la radioactivité diminue au niveau de la cavité cardiaque et du poumon. Il est important d'observer qu'une certaine radioactivité apparaît dans la partie basse sécrétrice de l'estomac (fundus), ainsi que dans la zone ano-rectale également riche en glandes sécrétrices.

.Au temps 6 heures, la radioactivité est toujours importante dans le foie, la vésicule biliaire, l'intestin et la vessie. Elle augmente dans les zones sécrétrices de l'estomac et de l'intestin, tandis qu'elle diminue dans le rein, la rate, le poumon et le derme.

.Au temps 24 heures, le foie et l'intestin, plus particulièrement le caecum, conservent une part relativement importante de la radioactivité. Celle-ci est encore bien marquée au niveau du foie, de la vessie et de l'estomac. La présence de petites quantités de radio-isotope s'observe dans la rate, le rein et le derme. Les disques intervertébraux apparaissent nettement marqués.

.Au temps 48 heures, la radioactivité se retrouve principalement au niveau du foie, de la rate et des disques intervertébraux. Elle s'observe à un degré moindre dans le caecum, le rein, le derme et la muqueuse gastrique.

- Sulfate marqué :

Au temps 24 heures, la radioactivité se retrouve principalement au niveau des disques intervertébraux, de certains cartilages de conjugaison et de l'intestin, plus particulièrement du caecum. L'estomac, le derme et le rein en retiennent une certaine partie. Le foie et le système nerveux central en sont pratiquement dépourvus.

- O.S.S. marqué :

Au temps 30 minutes, la radioactivité est surtout importante dans le rein, principalement au niveau de la zone centrale, dans la vessie ainsi que dans le tractus intestinal. Le foie, la cavité cardiaque, le poumon et le derme en retiennent une certaine quantité. L'estomac paraît dépourvu de toute trace de radioactivité.

Au temps 24 heures (résultats non figurés sur la planche), la radioactivité résiduelle est extrêmement faible, et nous n'avons pu obtenir de cliché significatif.

C. Discussion.

L'ensemble des résultats permet de préciser les points suivants :

- Après son administration par voie intraveineuse, le T.S.S. est transporté par le sang et se trouve disséminé en de nombreux points, sa localisation suivant en gros la vascularisation. Il est retenu par le foie et par le rein, et l'action excrétrice de ces deux organes explique la présence du produit dans la vésicule biliaire, dans le tractus intestinal et dans la vessie. L'action diurétique s'exerce tant que la quantité de T.S.S. présente au niveau du rein est suffisamment importante, cette quantité dépendant elle-même de la concentration dans le sang circulant.

- La transformation du T.S.S. paraît s'opérer progressivement dès le début de l'action. Il est permis de penser que le foie est le siège principal de ce catabolisme.

PLANCHE II

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES sacrifiées 30 minutes après administration de T.S.S. marqué au ^{35}S

Fig 1 : La radioactivité est importante au niveau du rein (r), du foie (f), de la vessie (v), de certaines anses du tractus intestinal (i). La présence de radioactivité s'observe à des degrés moindres dans le derme (d), le péricarde (pe), la cavité cardiaque (cc), la rate (ra).
On peut noter l'absence totale de radioactivité dans le système nerveux central (snc).

Fig 2 : La radioactivité se localise aux mêmes points que sur la figure 1 : rein (r), foie (f), derme (d), péricarde (pe), cavité cardiaque (cc), rate (ra).
Elle se retrouve également dans le poumon (po). On peut observer l'absence de radioactivité dans l'estomac (e).

Fig 3 : La radioactivité s'observe au niveau du foie (f), du poumon (po), des anses intestinales (i), du derme (d). Les vertèbres (ve) sont peu marquées. Il n'existe aucune trace dans le système nerveux central (snc).

Fig 4 : Les observations sont les mêmes que dans les cas précédents en ce qui concerne le foie (f), la vessie (v), le derme (d), l'estomac (e), le système nerveux central (snc).

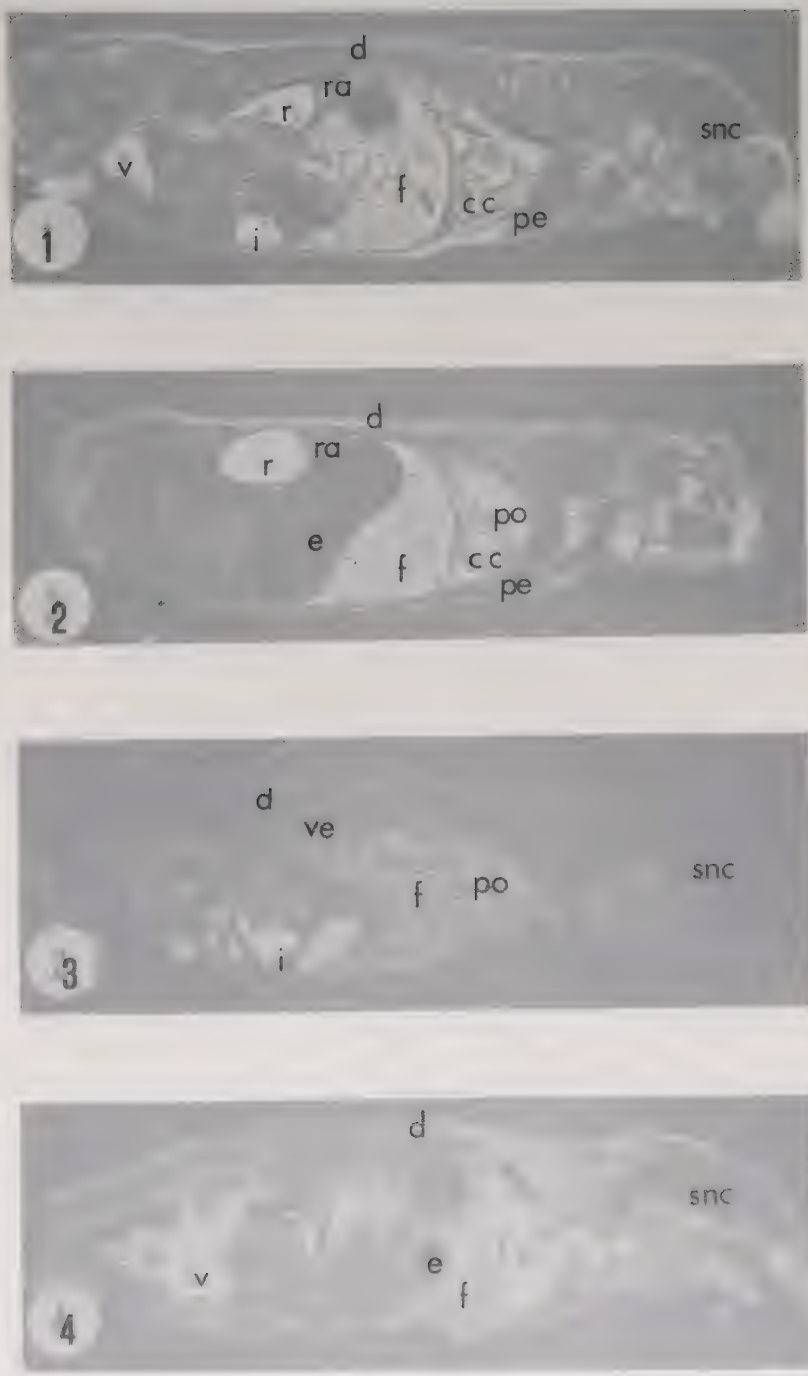

d
ra
r
snc
v
f
c c
pe
1
i
d
ra
r
po
e
f
c c
pe
2
d
ve
snc
f
po
3
i
d
snc
e
v
f
4

PLANCHE II

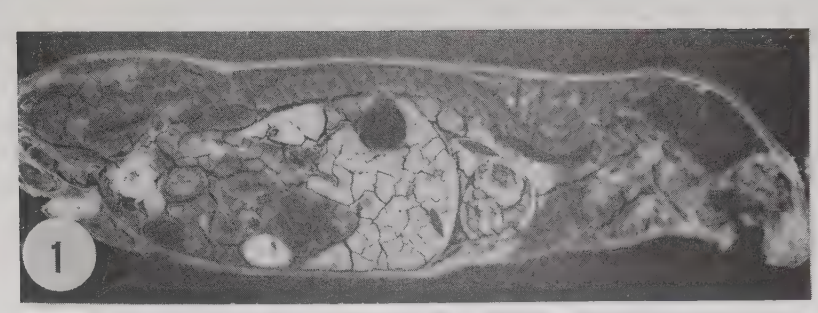
AUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES
après administration de T.S.S. marqué au ^{35}S

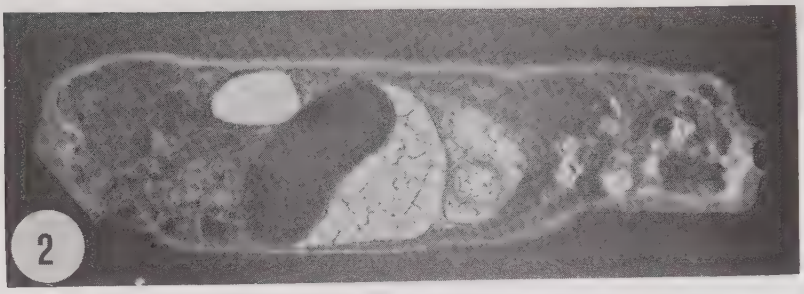
Fig 1 : La radioactivité est importante au niveau du rein (r), du foie (f), de la vessie (v), des premières anses du tractus intestinal (i). La présence de radioactivité s'observe à des degrés moindres dans le derme (d), le péricarde (pe), la cavité cardiaque (cc), la rate (ra).
On peut noter l'absence totale de radioactivité dans le système nerveux central (snc).

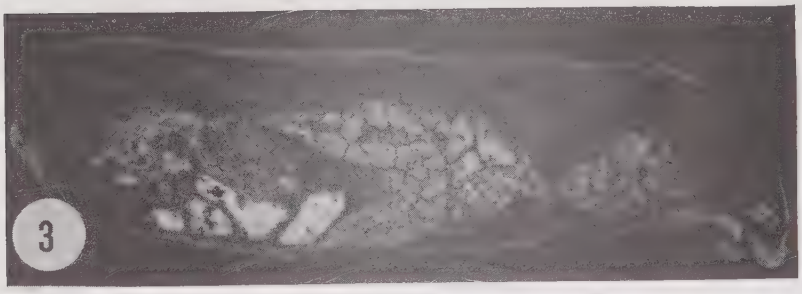
Fig 2 : La radioactivité se [illegible] mêmes points que sur la figure 1 : rein (r), foie (f), derme (d), péricarde (pe), cavité cardiaque (cc), rate (ra).
Elle se retrouve également dans le poumon (po). On peut observer l'absence de radioactivité dans l'estomac (e).

Fig 3 : La radioactivité s'observe au niveau du foie (f), du poumon (po), des anses intestinales (i), du derme (d). Les vertèbres (ve) sont peu marquées. Il n'existe aucune trace dans le système nerveux central (snc).

Fig 4 : Les observations sont les mêmes que dans les cas précédents en ce qui concerne le foie (f), la vessie (v), le derme (d), l'estomac (e), le système nerveux central (snc).


1


2


3

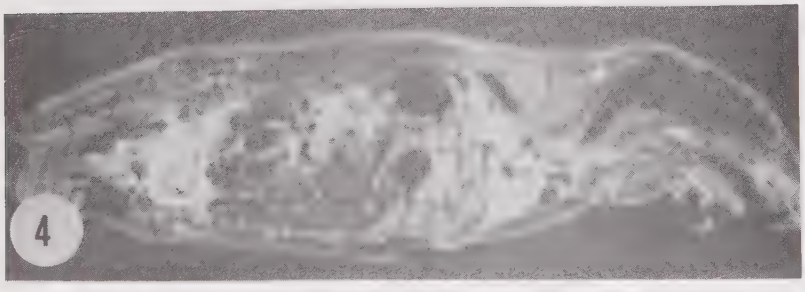

4

PLANCHE III

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES

sacrifiées deux heures (Fig. 1 et 2) et six heures (Fig. 3 et 4)

après administration de T.S.S. marqué au ^{35}S.

Fig 1 : 2 HEURES

La radioactivité est particulièrement marquée dans la vésicule biliaire (vb) dans la vessie (v) et les anses intestinales (i). Elle se retrouve en quantité notable dans le foie (f), le derme (d), le rectum (re). Elle apparaît faiblement dans les disques intervertébraux (di).

Fig 2 : 2 HEURES

La radioactivité s'observe surtout dans les anses intestinales (i) et la vessie (v) et à un degré moindre dans le foie (f), le rein(r) et le derme (d).

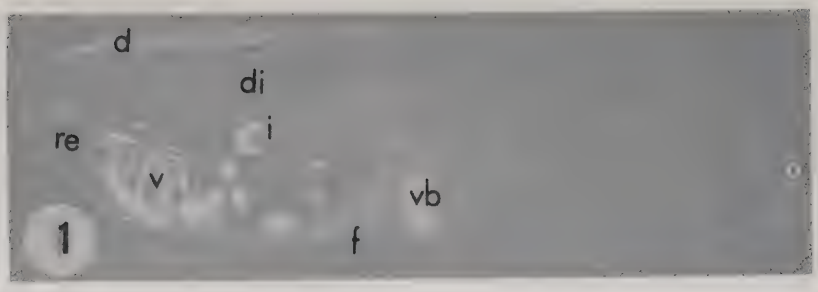
Elle apparaît dans l'estomac (e) au niveau du fundus. Elle est peu importante dans le poumon (po) et le coeur (c[illegible]).

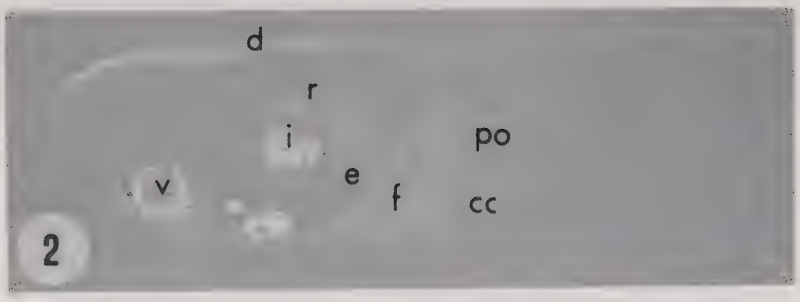
Fig 3 : 6 HEURES

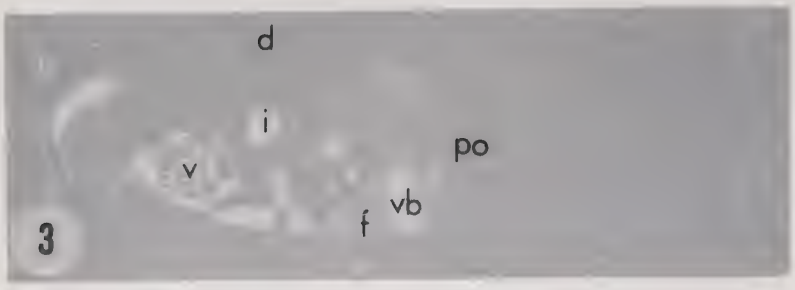
La radioactivité est très importante dans la vésicule biliaire (vb), l'intestin (i), la vessie (v), moins importante dans le foie (f). Elle est très faible dans le poumon (po) et dans le derme (d).

Fig 4 : 6 HEURES

La radioactivité est surtout élevée dans l'intestin et plus particulièrement dans le caecum (i). Elle présente une certaine importance dans le rein (r), la rate (ra), le foie (f), l'estomac (e).


d
di
re
i
v
vb
f
1


d
r
i
po
e
v
f
cc
2


d
i
po
v
vb
f
3

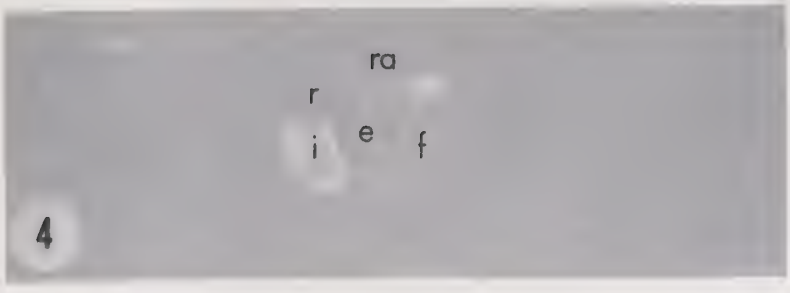

ra
r
e
i
f
4

PLANCHE III

MACROAUTORADIOGRAPHIES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES

sacrifiées deux heures (Fig. 1 et 2) et six heures (Fig. 3 et 4)

après administration de T.S.H. marqué au ^{35}S.

Fig 1 : 2 HEURES

La radioactivité est particulièrement marquée dans la vésicule biliaire (vb) dans la vessie (v) et les anses intestinales (i). Elle se retrouve en quantité notable dans le foie (f), le derme (d), le rectum (re). Elle apparaît faiblement dans les disques intervertébraux (di).

Fig 2 : 2 HEURES

La radioactivité s'observe surtout dans les anses intestinales (i) et la vessie (v) et à un degré moindre dans le foie (f), le rein(r) et le derme (d).

Elle apparaît dans l'estomac (e) au niveau du fundus. Elle est peu importante dans le poumon (po) et le coeur (cc).

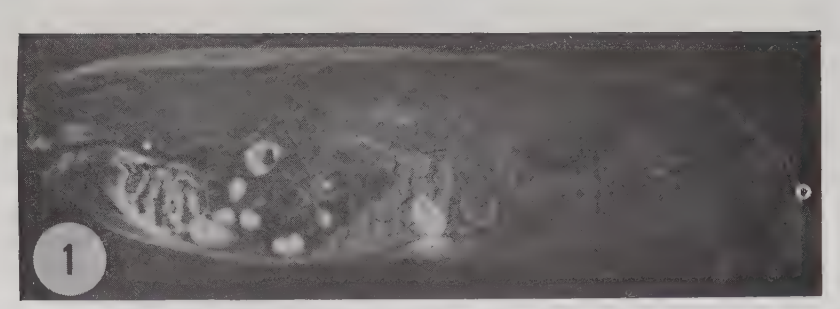
Fig 3 : 6 HEURES

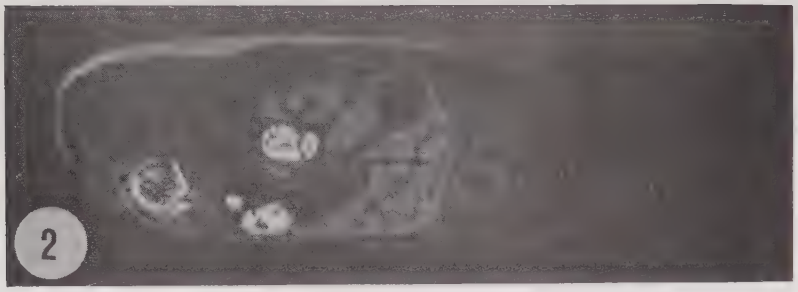
La radioactivité est très importante dans la vésicule biliaire (vb), l'intestin (i), la vessie (v), moins importante dans le foie (f). Elle est très faible dans le poumon (po) et dans le derme (d).

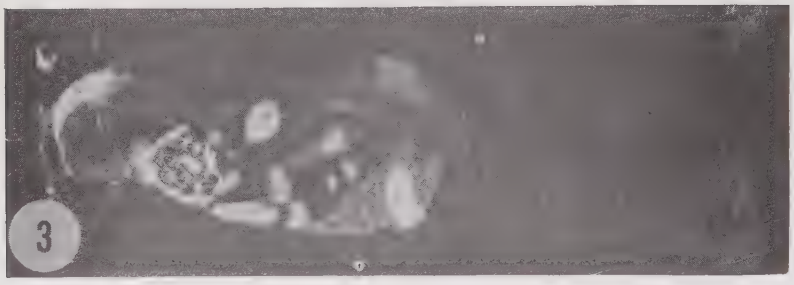
Fig 4 : 6 HEURES

La radioactivité est surtout élevée dans l'intestin et plus particulièrement dans le caecum (i). Elle présente une certaine importance dans le rein (r), la rate (ra), le foie (f), l'estomac (e).

III







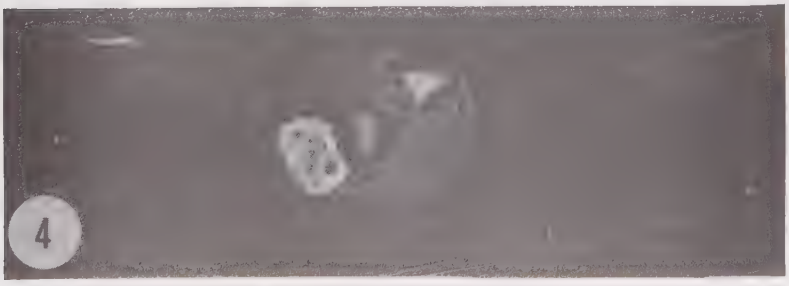


PLANCHE IV

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES
sacrifiées 12 heures (Fig. 1 et 2) et 24 heures (Fig. 3 et 4)
après administration de T.S.S. marqué au ^{35}S

Fig 1 : 24 HEURES

L'intestin et plus particulièrement le caecum (i) conserve une partie relativement importante de la radioactivité. Celle ci est encore bien marquée dans le foie (f), la vessie (v) et la zone sécrétrice de l'estomac (e). Elle est relativement importante au niveau des disques intervertébraux (di). Le derme (d) apparaît peu marqué.

Fig 2 : 24 HEURES

La radioactivité est importante dans l'intestin, principalement dans le caecum (i), dans la zone sécrétrice de l'estomac (e), dans le foie (f). Elle s'observe également à un degré moindre dans la rate (ra) et le rein (r).

Fig 3 : 48 HEURES

Le foie (f) est nettement plus marqué que les autres organes. Les disques intervertébraux (di) sont bien marqués. L'intestin (i), le derme (d) et la muqueuse gastrique (e) conservent des traces de radioactivité.

Fig 4 : 48 HEURES

La radioactivité est surtout importante au niveau du foie (f) et de la rate (ra). De faibles quantités apparaissent dans l'intestin (i), le rein (r) et la muqueuse gastrique (e).

d
di
i
i
v
i
e
f
1

ra
r
e
f
i
2

d
di
i
e
f
i
3

r
ra
i
e
f
4

PLANCHE VI

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES BACTERIAIRES DE SOURIS ENTIERES
sacrifiées 12 heures (Fig. 1 et 2) et 24 heures (Fig. 3 et 4)
après administration de S.S. marqué au ^{35}S

Fig 1 : 24 HEURES

Fig 2 : 24 HEURES

La radioactivité est importante dans l'intestin, principalement dans le caecum (i), dans la zone sécrétrice de l'estomac (e), dans le foie (f). Elle s'observe également à un degré moindre dans la rate (ra) et le rein (r).

Fig 3 : 48 HEURES

Le foie (f) est nettement plus marqué que les autres organes. Les disques intervertébraux (di) sont bien marqués. L'intestin (i), le derme (d) et la muqueuse gastrique (e) conservent des traces de radioactivité.

Fig 4 : 48 HEURES

La radioactivité est surtout importante au niveau du foie (f) et de la rate (ra). De faibles quantités apparaissent dans l'intestin (i), le rein (r) et la muqueuse gastrique (e).

IV

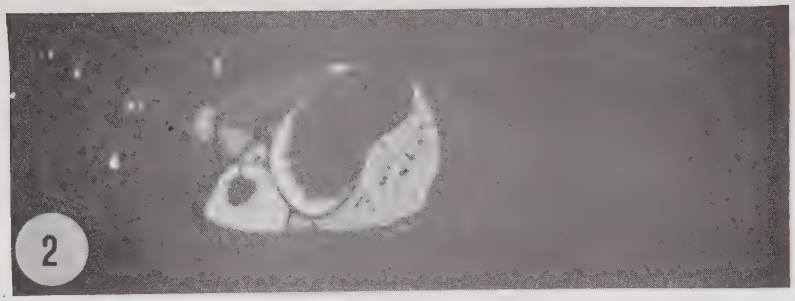


PLANCHE V

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES
sacrifiées 24 heures après administration de sulfate de potassium marqué au ^{35}S (Fig. 1 et 2) et 30 minutes après administration de O.S.S. marqué au ^{35}S (Fig. 3 et 4)

Fig 1 : SULFATE DE POTASSIUM MARQUE-24 HEURES

La radioactivité est importante au niveau des disques intervertébraux (di) de certains cartilages de conjugaison (ca) et de l'intestin, plus particulièrement du caecum (i). L'estomac (e), le derme (d) et le rein (r) en retiennent une certaine partie. Le foie (f) et le système nerveux central (snc) en sont pratiquement dépourvus.

Fig 2 : SULFATE DE POTASSIUM MARQUE-24 HEURES

Mêmes observations que dans le cas de figure précédent en ce qui concerne les disques intervertébraux (di), l'intestin (i), le foie (f), le derme (d) et le système nerveux central (snc).

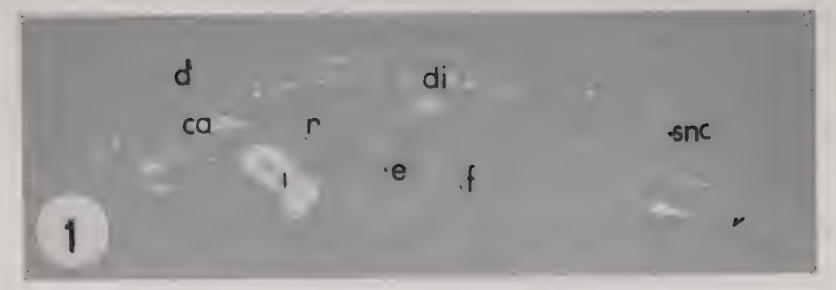
Fig 3 : O.S.S. MARQUE-30 MINUTES

La radioactivité est principalement concentrée au niveau de la vessie (v) et de l'intestin (i). La cavité cardiaque (cc), le foie (f) et le derme (d) en retiennent une certaine quantité. L'estomac (e) en paraît dépourvu.

Fig 4 : O.S.S. MARQUE-30 MINUTES

Le rein (r) retient une certaine quantité de radioactivité principalement dans la zone centrale. Le poumon (po) est relativement plus marqué que le foie (f) et le derme (d). L'estomac (e) paraît dépourvu de radioactivité.

V



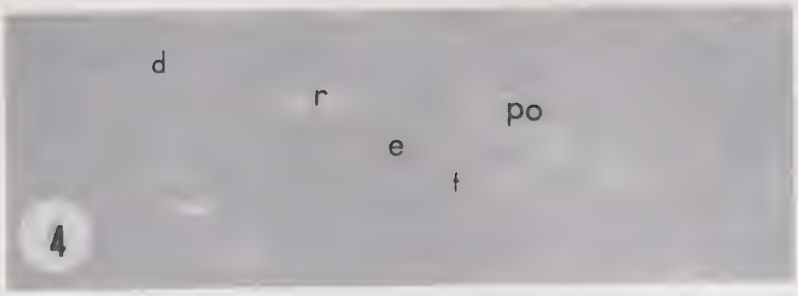


PLANCHE V

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE SOURIS ENTIERES
sacrifiées 24 heures après administration de sulfate de potassium marqué au ^{35}S (Fig. 1 et 2) et 30 minutes après administration de O.S.S. marqué au ^{35}S (Fig. 3 et 4).

Fig 1 : SULFATE DE POTASSIUM MARQUE-24 HEURES

La radioactivité est importante au niveau des disques intervertébraux (di) de certains cartilages de conjugaison (cal) et de l'intestin, plus particulièrement au niveau (i). L'estomac (e), le derme (d) et le rein (r) en contiennent une certaine quantité. Seul le système nerveux central (snc) en sont pratiquement dépourvus.

Fig 2 : SULFATE DE POTASSIUM MARQUE-24 HEURES

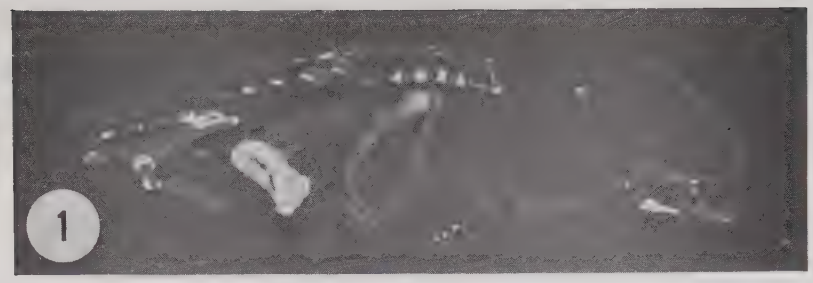
Mêmes observations que dans le cas de figure précédent en ce qui concerne les disques intervertébraux (di), l'intestin (i), le foie (f), le derme (d) et le système nerveux central (snc).

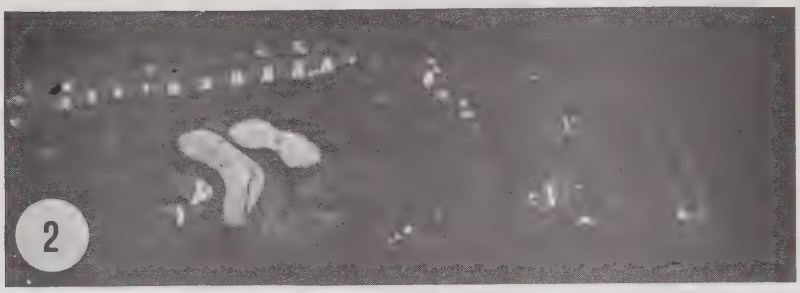
Fig 3 : O.S.S. MARQUE-30 MINUTES

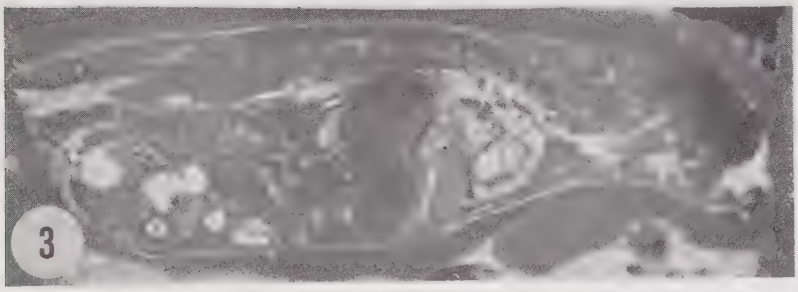
La radioactivité est principalement concentrée au niveau de la vessie (v) et de l'intestin (i). La cavité cardiaque (cc), le foie (f) et le derme (d) en retiennent une certaine quantité. L'estomac (e) en paraît dépourvu.

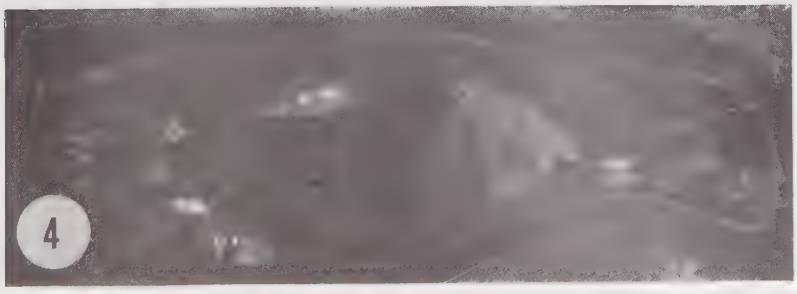
Fig 4 : O.S.S. MARQUE-30 MINUTES

Le rein (r) retient une certaine quantité de radioactivité principalement dans la zone centrale. Le poumon (po) est relativement plus marqué que le foie (f) et le derme (d). L'estomac (e) paraît dépourvu de radioactivité.


1


2


3


4

- Le T.S.S. ou ses catabolite soufrés peuvent également se fixer au niveau de certains organes tels que la rate, le péricarde et la peau.

- Dès la deuxième heure, le radio-isotope apparaît dans différentes sécrétions au niveau du fundus de l'estomac ainsi que dans le caecum et dans la zone ano-rectale. Ces sécrétions conservent une certaine radioactivité après 48 heures.

- La radioactivité se fixe progressivement au niveau des disques intervertébraux et de certains cartilages de conjugaison où elle est parfaitement marquée après 24 heures. Cet effet s'observe également après l'administration du sulfate marqué, alors que dans ce cas le foie ne retient pratiquement pas de radio-isotope.

- Il est permis de penser que le T.S.S. subit au niveau du foie, grâce à l'équipement enzymatique de cet organe, un catabolisme à la suite duquel le soufre du cycle dithiole-thione subit la même destinée que celui qui provient d'un sulfate. En particulier, ce soufre se trouve incorporé dans la peau, les sécrétions, les disques intervertébraux, les cartilages de conjugaison et, d'une manière générale, dans tous les mucopolysaccharides acides (chondroïtine-sulfates). Il entre dans ce qu'il est convenu d'appeler le "cycle du soufre" et participe alors à la constitution des différents composés soufrés de l'organisme. Ce soufre s'élimine ensuite en majeure partie à l'état oxydé sous forme de sulfate.

- Le O.S.S., pratiquement inactif chez la souris, n'est retenu qu'en très faible quantité. Il ne se fixe guère dans la zone active du rein où il apparaît surtout au niveau de la papille. Ce dernier caractère peut rendre compte de l'absence d'action diurétique. Il est vraisemblable que la faible quantité de O.S.S. retenue par l'organisme subit une dégradation catabolique comparable à celle qui concerne le T.S.S..

2. REPARTITION DU T.S.S. MARQUE DANS LES ORGANES ET EXCRETA DE RAT.

Pour évaluer la possibilité d'extrapoler à d'autres espèces

les résultats obtenus chez la souris, nous avons entrepris de doser la radioactivité dans les excreta et broyats d'organes de rats ayant reçu du T.S.S. marqué.

A. Technique.

Des rats de 200 g environ reçoivent par voie intrapéritonéale 96 µCi de T.S.S. marqué, correspondant à une dose de 50 mg/kg, en solution dans 5 ml de soluté de NaCl à 9 g/l.

Chaque animal est placé dans une cage à métabolisme spéciale permettant de recueillir les excreta sans mélange et d'analyser les gaz expirés.

Les rats sont sacrifiés à des temps variables après l'administration du produit, 1 heure et 48 heures dans le cas présent.

Différents organes sont prélevés, pesés et broyés. Pour chaque organe, une partie aliquote du broyat homogénéisé (environ 10 mg) est placée dans un flacon servant au comptage et additionné de 1 ml de solution M d'hydroxyde de Hyamine 10-X (hydroxyde de p-(diisobutyl-crésoxyéthoxyéthyl) diméthylbenzylammonium) dans le méthanol. Le flacon est bouché et placé à l'étuve à 60 °C pendant 24 heures ou jusqu'à liquéfaction complète de la prise d'essai. Après refroidissement, on ajoute dans le flacon 15 ml de liquide de scintillation Diotol et on procède au comptage. Pour l'urine, le Diotol peut être directement ajouté à la prise d'essai.

B. Résultats.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant (tableau V. 4.).

Ils font apparaître que la fixation du T.S.S. au niveau du foie, du rein, de la rate et de l'intestin semble relativement moins importante chez le rat que chez la souris. Cette différence peut être la conséquence d'un métabolisme plus actif chez le rat.

Aucune trace de radioactivité n'a été décelée dans l'air expiré.

Tableau V. 4.

Répartition du ^{35}S dans les excreta et organes de rats ayant reçu du T.S.S. marqué

rats de 200 g ayant reçu 10 mg de T.S.S. par voie intrapéritonéale (96 µCi)

	1 heure	48 heures
Urine	11,0 %	53,6 %
Fécès	0,0 %	1,0 %
Sang	9,1 %	0,2 %
Foie	3,7 %	0,3 %
Rein	3,0 %	0,8 %
Rate	0,9 %	0,1 %
Intestin	17,2 %	1,0 %
Peau, muscles, squelette	55,1 %	43,0 %
Pourcentage éliminé	11,0 %	54,6 %
Pourcentage retenu	89,0 %	45,4 %

(moyennes obtenues à partir de deux résultats)

3. LOCALISATION DU T.S.S. ET DU O.S.S. MARQUES DANS LE REIN DE RAT. ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE.

A. Technique.

Les produits marqués sont administrés dans les conditions habituelles. Les reins sont prélevés après 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 6 heures et traités de la même manière que les souris entières. En ce qui concerne le O.S.S. l'étude n'a pu être faite que pour le temps de 1 heure.

B. Résultats.

Les résultats s'expriment par les clichés représentés sur la Planche VI.

- T.S.S. marqué :

.Au temps 30 minutes, la radioactivité est présente dans toutes les zones du rein. Elle est cependant plus marquée dans la zone corticale, dans la zone médullaire externe où elle apparaît sur les clichés sous l'aspect d'un arc plus clair, et dans la partie profonde de la zone médullaire interne ainsi que dans la papille. Il faut souligner que c'est dans la partie externe de la zone médullaire, où se situe le segment de dilution médullaire, que nous avons localisé l'action du T.S.S..

.Au temps 1 heure, la concentration dans la zone médullaire externe a diminué et la radioactivité se retrouve principalement dans la zone corticale, dans la partie profonde de la zone médullaire interne et dans la papille.

.Au temps 2 heures, la répartition de la radioactivité est sensiblement la même, mais son intensité a diminué.

.Au temps 6 heures, la radioactivité résiduelle est très faible dans toutes les zones du rein.

- O.S.S. marqué :

Au temps 1 heure, la radioactivité est présente dans toutes les zones du rein, mais elle est particulièrement importante dans la partie profonde de la zone médullaire interne et dans la papille, c'est à dire dans la région où se trouve l'urine définitive.

C. Discussion.

Pendant la phase d'action diurétique, le T.S.S. se trouve fixé principalement au point où il est censé agir. Sa concentration dans

PLANCHE VI

MACROAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE REINS DE RATS
sacrifiés 30 minutes (Fig. 1), 1 heure (Fig. 2), 2 heures (Fig. 3) et 6 heures (Fig. 4)
après administration de T.S.S. marqué au ^{35}S
et 1 heure après administration de O.S.S. marqué au ^{35}S (Fig. 5)

Fig 1 : T.S.S. MARQUE - 30 MINUTES

Le T.S.S. se retrouve dans toutes les zones du rein. Sa concentration est cependant plus marquée suivant un arc situé dans la zone médullaire externe.

Fig 2 : T.S.S. MARQUE - 1 HEURE

La radioactivité est plus importante dans la zone corticale et dans la partie profonde de la zone médullaire.

Fig 3 : T.S.S. MARQUE - 2 HEURES

La radioactivité se trouve localisée comme dans le cas de figure précédent mais son intensité est moindre.

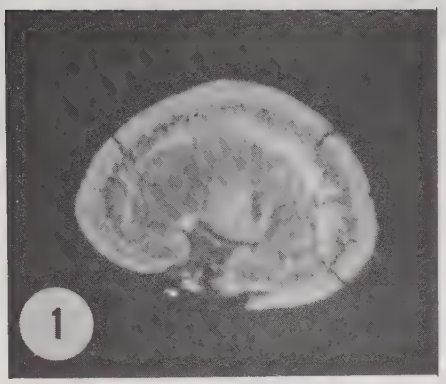
Fig 4 : T.S.S. MARQUE - 6 HEURES

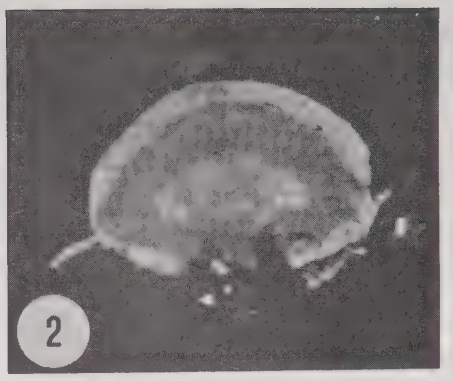
La radioactivité a presque totalement disparu.

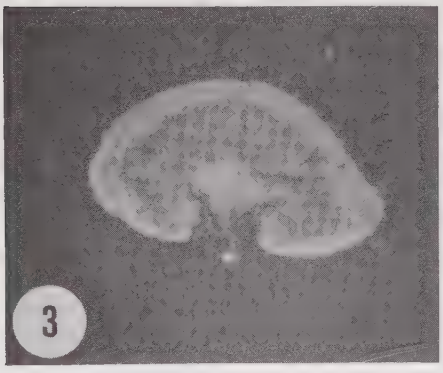
Fig 5 : O.S.S. MARQUE - 1 HEURE

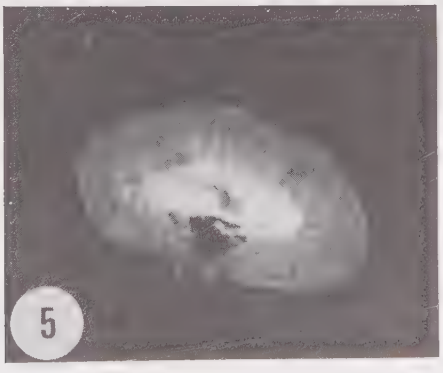
La radioactivité se trouve concentrée dans la zone médullaire interne et la papille.

VI









les autres zones paraît en rapport avec leur vascularisation ainsi qu'avec le processus de concentration de l'urine. L'intensité de l'action diurétique dans le temps peut être mise en relation avec l'importance de la fixation du produit au niveau de la partie médullaire du segment de dilution. Ce point de vue est accrédité par le fait que le O.S.S., qui n'est que faiblement diurétique chez le rat, n'est à aucun moment fixé en quantité importante aux points où s'effectue la réabsorption active des ions (zone corticale et zone médullaire externe).

A l'issue de la phase diurétique, le T.S.S. s'élimine progressivement du parenchyme rénal tandis que, parallèlement, sa concentration diminue dans le sang circulant.

IV. ETAT ET MODALITES DE TRANSPORT DU T.S.S. DANS LE SANG PENDANT LA PHASE D'ACTION DIURETIQUE.

Il nous a paru important de définir les modalités de la présence du T.S.S. dans le sang, en particulier sa répartition entre le plasma et les éléments figurés et sa capacité de liaison avec les protéines.

1. REPARTITION DU T.S.S. ENTRE LE PLASMA ET LES ELEMENTS FIGURES DANS LE SANG DE RAT.

A. Technique.

Les rats reçoivent dans les conditions habituelles 10 mg de T.S.S. marqué (environ 100 µCi).

Le sang est prélevé par ponction aortique et recueilli sur héparine. Le plasma est séparé des éléments figurés par centrifugation en tube gradué pendant 10 minutes à 3000 tours/mn; l'hématocrite est également déterminé au cours de cette opération. Le culot de centrifugation est lavé à trois reprises avec du soluté physiologique de NaCl à 9 g/l.

Les comptages sont pratiqués sur des prises de 100 µl de sang total, de plasma et de culot lavé.

Les échantillons sont traités suivant la technique recommandée par PACKARD, qui utilise les deux solutions suivantes :

1°) Soluène 100-isopropanol :1/1

2°) HCl 0,5 N-Instagel :1/9.

L'échantillon est mélangé dans un flacon de comptage avec 1,5 ml de la solution Soluène-isopropanol. Ajouter 0,5 ml de solution d'eau oxygénée à 35 %; agiter immédiatement. Fermer le flacon et conserver 30 minutes à température ambiante. Ajouter 15 ml de solution HCl-Instagel et procéder au comptage.

B. Résultats.

Les résultats s'expriment dans le tableau suivant (tableau V. 5.).

Tableau V. 5.

Répartition du T.S.S. entre le plasma et les éléments figurés dans le sang de rat.

rats de 200 g ayant reçu 10 mg de T.S.S. par voie intrapéritonéale (95 µCi) comptages sur 100 µl

Rat N°	1	3	
Temps	30 minutes	1 heure	
Radioactivité du sang total	147.000	190.000	des./mn
Radioactivité du plasma	190.000	235.400	-
Radioactivité des globules	53.400	121.000	-
Hématocrite	40 %	40 %	
% de T.S.S. dans le plasma	78 %	74 %	
% de T.S.S. dans les globules	22 %	26 %	

Ces résultats montrent que le T.S.S. se trouve en majeure partie dans le plasma. Il n'est pas exclu qu'une fraction du produit soit retenue par adsorption à la surface des éléments figurés.

2. POSSIBILITE D'EXISTENCE D'UNE LIAISON ENTRE LE T.S.S. ET LES PROTEINES SERIQUES.

Compte tenu de ses propriétés chimiques, il est permis de penser que le T.S.S., comme d'ailleurs de nombreuses substances médicamenteuses, se trouve en partie lié aux protéines sériques, et plus particulièrement à la fraction albumine. Pour révéler cette possibilité, nous avons recouru dans un premier temps aux méthodes classiques d'électrophorèse, de chromatographie et de séparation des fraction protéiques par action des sels.

A. Electrophorèse du sérum de rat et de chien.

Les sérums, provenant de sang prélevé par ponction aortique sur des rats ayant reçu 100 mg/kg de T.S.S. par voie intrapéritonéale ou par ponction veineuse sur des chiens ayant reçu une dose de 25 mg/kg en perfusion, ont été soumis aux techniques classiques d'électrophorèse sur bandes de papier ou d'acétate de cellulose à pH 8,6. Dans certains cas, les rats avaient reçu du T.S.S. marqué.

Le produit peut aisément se localiser sur les bandes grâce à sa coloration et, dans certains cas, grâce à sa radioactivité.

Aucune expérience n'a permis de révéler la présence de T.S.S. au niveau d'une quelconque fraction protéique. Dans tous les cas, le produit n'a subi qu'un faible déplacement vers le pôle positif comparable à celui subi par le témoin en solution aqueuse physiologique. Ces résultats ont été confirmés par radioélectrophorèse des sérums de rats ayant reçu du T.S.S. marqué.

Compte tenu des conditions expérimentales (pH, dilution, influence du support) et de la labilité probable d'une liaison entre le T.S.S. et les protéines sériques, ces résultats négatifs ne permettent pas d'exclure la possibilité d'existence d'une combinaison protéique.

En fait, la méthode électrophorétique ne semble utilisable que pour un petit nombre de médicaments, principalement des colorants, qui sont fortement liés aux protéines sériques (BENNHOLD 1967).

B. Etude chromatographique et radiochromatographique de sérums de rats prélevés pendant la phase d'action diurétique.

Les expériences, réalisées au moyen de T.S.S. marqué et suivant un protocole précédemment décrit, ont fourni des résultats identiques par chromatographie et par radiochromatographie.

La coloration jaune des spots ainsi que la radioactivité restent en majeure partie au point de dépôt de l'échantillon. Le déplacement du solvant provoque cependant la formation d'une traînée jaune continue dont l'extrêmité présente sensiblement le même Rf que le T.S.S. témoin.

Les Rf calculés à partir de six expériences offrent les valeurs suivantes :

	Isopropanol ammoniacal	Solvant de PARTRIDGE
Sérum de rat	0,68 ± 0,03	0,71 ± 0,07
T.S.S.	0,69 ± 0,04	0,73 ± 0,07

Le fait que la majeure partie du produit ne subit aucun déplacement et qu'une faible partie se répand sous forme de traînée suivant le sens de migration du solvant permet de penser que le T.S.S. se trouve dans le sérum principalement sous la forme d'une combinaison protéique labile qui se détruit progressivement durant la séparation chromatographique.

C. Caractérisation de la fraction protéique liée au T.S.S..

a) Technique.

Les rats reçoivent du T.S.S. marqué dans les conditions habituelles. Le sang est prélevé par ponction aortique. Après coagulation, le sérum est séparé par centrifugation.

Un premier comptage est pratiqué directement sur le sérum.

Un deuxième comptage est pratiqué sur le sérum déprotéinisé par action de l'acide trichloracétique. A une partie aliquote du sérum on ajoute un volume égal de solution d'acide trichloracétique à 20 %; on mélange et on sépare le précipité protéique par centrifugation. Le comptage se fait sur une partie du surnageant.

Un troisième comptage est pratiqué sur le sérum privé de globulines par précipitation sous l'action du sulfate d'ammonium à demi-saturation. A une partie aliquote du sérum on ajoute un volume égal de solution saturée de sulfate neutre d'ammonium; on mélange, on laisse reposer 15 minutes et on sépare le précipité de globulines par centrifugation. Le comptage se fait sur le surnageant.

Les comptages se pratiquent sur des prises d'essai de 100 µl additionnées de 15 ml de liquide de scintillation.

Des corrections sont apportées aux comptages enregistrés en fonction des dilutions et des précipitations. A partir des valeurs corrigées on peut calculer les pourcentages du produit sous forme libre et sous forme liée aux albumines et globulines.

b) Résultats.

Les résultats s'expriment dans le tableau suivant (tableau V. 6.).

Tableau V. 6.

Etat du T.S.S. dans le sérum de rat.

rats de 200 g ayant reçu 10 mg de T.S.S. par voie intrapéritonéale (95 µCi)

Rat N° →	1	2	3
Temps →	30 minutes	30 minutes	1 heure
% libre	24,2 %	21,8 %	12,8 %
% lié aux protéines (par différence)	75,8 %	78,2 %	87,2 %
% lié aux globulines	12,5 %	13,4 %	12,7 %
% lié aux albumines	63,3 %	64,8 %	74,5 %

Ces résultats montrent que, dans les conditions expérimentales choisies, 80 % environ du T.S.S. se trouve lié aux protéines sériques, principalement aux albumines.

D. Discussion.

Les modalités des liaisons des médicaments avec les protéines et leurs incidences pharmacodynamiques ont été étudiées par de nombreux auteurs dont SCATCHARD (1949), MEYER et GUTMAN (1968) et GLASSON (1970).

La liaison avec les protéines étant en règle générale réversible et dépendant de la structure protidique, l'addition d'un réactif diluant et dénaturant tel que l'acide trichloracétique conduit à une surestimation du pourcentage de T.S.S. libre. Par ailleurs, le changement de force ionique consécutif à l'addition de la solution de sulfate d'ammonium est susceptible de modifier les conditions de liaison avec les fractions protéiques. Les résultats trouvés n'expriment donc que des valeurs approchées, mais ils révèlent cependant l'importance quantitative de la liaison du T.S.S. avec l'albumine. Les caractères physico-chimiques et pharmacologiques du produit permettaient de prévoir ce type d'association dont nous allons définir les caractères.

3. CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ASSOCIATION DU T.S.S. AVEC LES PROTEINES SERIQUES IN VITRO.

A. Etude spectrographique.

En l'absence de données dans la littérature, nous avons été conduit, comme nous l'avons déjà indiqué dans le chapitre II, à pratiquer des études spectrographiques sur les produits essayés, dans les domaines visible et U.V.. Ces recherches étaient inspirées initialement par la nécessité d'établir des méthodes de dosage des dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 dans les milieux biologiques. Elles ont apporté accessoirement des données intéressantes sur le mode de liaison de ces produits avec les protéines sériques.

a) Technique.

Les spectres d'absorption sont déterminés en spectrophotométrie différentielle de manière à éliminer les effets de l'absorption propre des milieux solvants.

Pour chaque produit nous opérons sur des solutions à 60, 30 et 15 µmole/l (la concentration de 60 µmole/l représente la valeur maximale compatible avec la sensibilité de l'appareil). Les composés sont étudiés en solution dans du soluté de NaCl à 9 g/l, dans des solutions d'albumine humaine et bovine à 50 g/l dans du sérum physiologique, et dans du sérum humain. La pureté des solutions d'albumine a été contrôlée par électrophorèse.

L'étude spectrographique est faite en premier lieu sur les solutions des produits, puis sur ces solutions additionnées de réactif de GROTE (0,5 ml de réactif pour 5 ml de solution et repos 30 mn).

b) Résultats.

Parmi de nombreux résultats, nous avons retenu ceux qui se rapportent au T.S.S., au O.S.S., au (thiényl-2)-5 thioxo-3 dithiole-1,2 carboxylate-4 de sodium que nous désignerons par ses initiales T.C.S., et à son dérivé sulfonique, le (sulfonato-5 thiényl-2)-5 thioxo-3 dithiole-1,2 carboxylate-4 disodique que nous désignerons également par ses initiales S.T.C.S.. les trois derniers composés ont été choisis pour servir de termes de comparaison en raison de leur parenté chimique avec le T.S.S. et de leur action pharmacodynamique différente. Rappelons que ces trois produits sont peu actifs et qu'ils s'éliminent rapidement (v. Tab. II. 3. p. 55).

Seuls sont représentés les spectres correspondant à des concentrations de 30 µmole/l. Les densités optiques fournies par les autres concentrations étudiées sont rigoureusement proportionnelles, c'est à dire que la loi de BEER-LAMBERT s'applique dans la gamme de concentration étudiée (10 à 60 µmole/l).

Les résultats s'expriment par les figures suivantes (figures V. 3. à V. 9.).

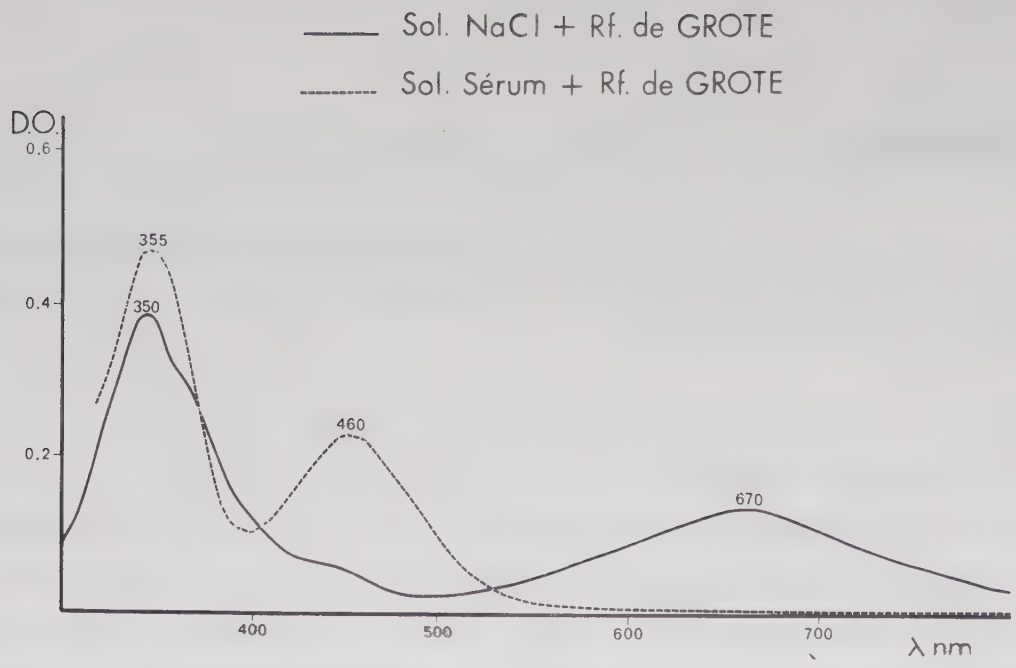


Fig. V. 7. - *Spectres se rapportant au T.S.S..*

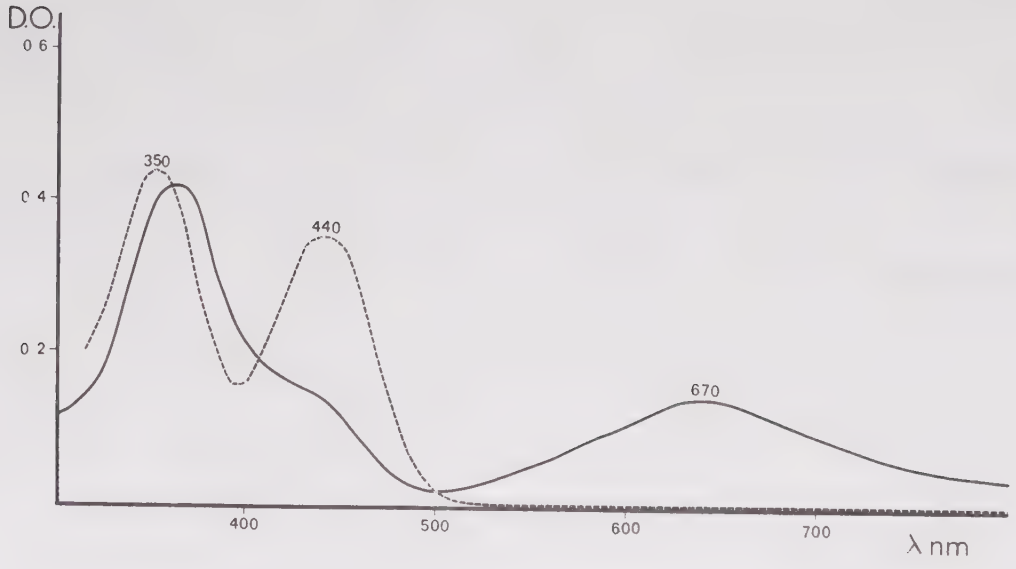


Fig. V. 8. - *Spectres se rapportant au T.C.S..*

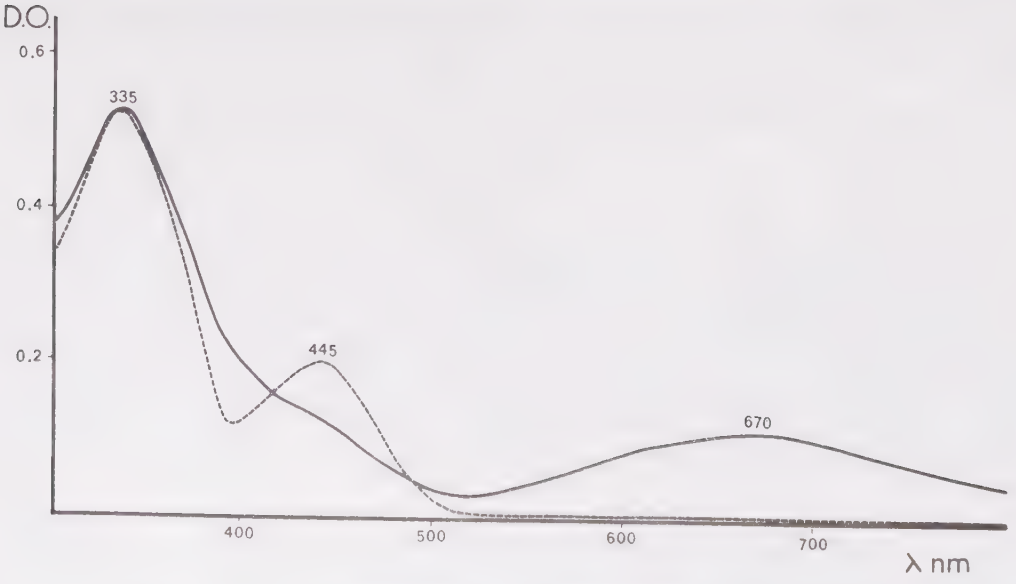


Fig. V. 9. - *Spectres se rapportant au S.T.C.S..*

——— Sol. NaCl

-.-.-.- Sol. Albumine

------ Sol. Sérum

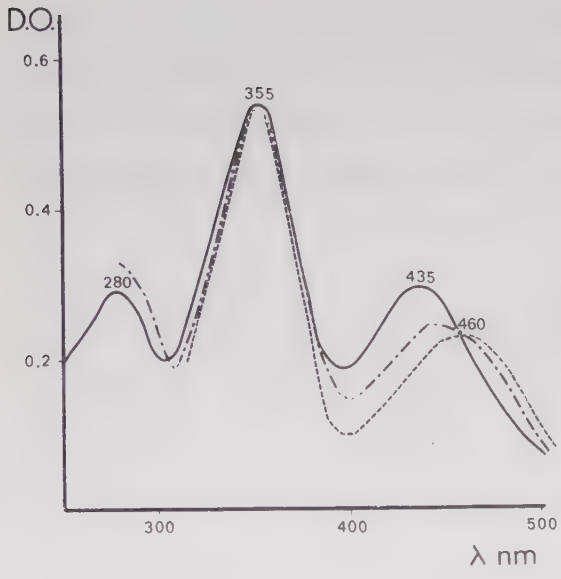


Fig. V. 3. - *Spectres du T.S.S.*

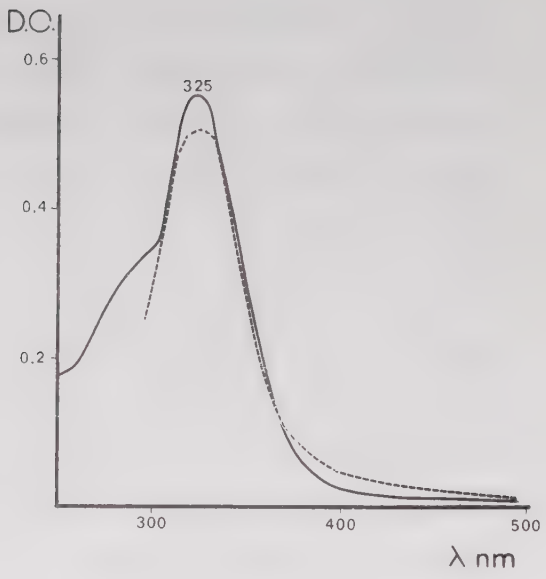


Fig. V. 4. - *Spectres du O.S.S.*

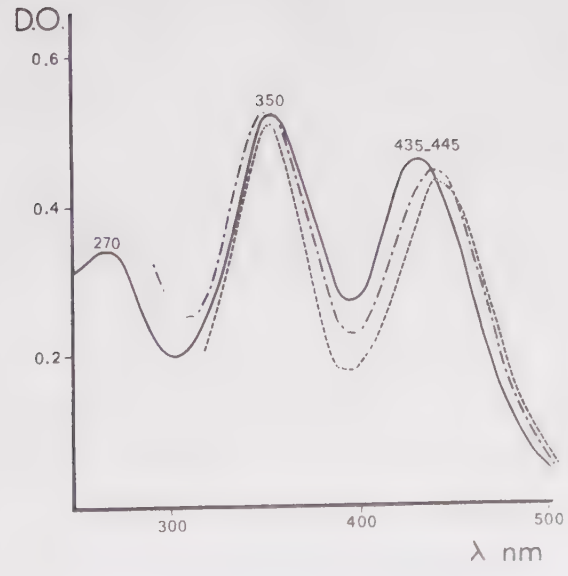


Fig. V. 5. - *Spectre du T.C.S.*

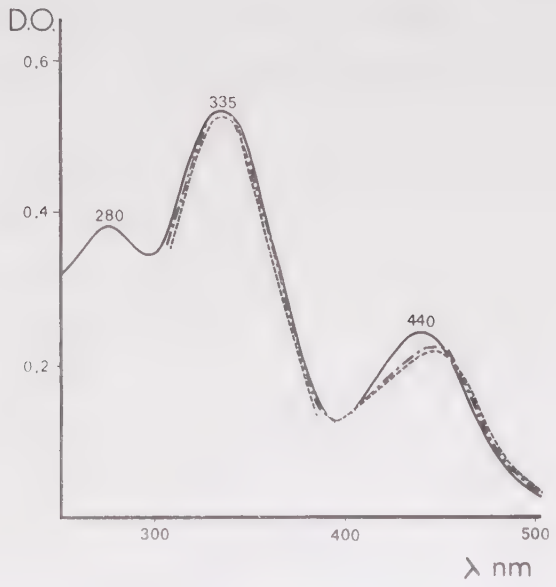


Fig. V. 6. - *Spectre du S.T.C.S.*

c) Discussion.

Les bandes d'absorption dans les 350 et 450-500 nm caractérisent l'ensemble structural dithiole-thione (LANDIS 1965).

Lorsque les produits sont solubilisés dans du sérum ou dans une solution d'albumine, la bande qui se situe dans le visible se trouve déplacée vers les grandes longueurs d'onde et son intensité diminue, tandis que la bande située à 350 nm ne subit pratiquement aucune modification.

L'action du réactif de GROTE, qui réagit avec la fonction thione, paraît dédoubler la bande située dans le visible en une bande à la limite du visible (qui vient "épauler" la bande à 350 nm) et en une seconde bande vers 670 nm, lorsque ce réactif est employé avec les solutions des produits dans le soluté physiologique de NaCl. Par contre, l'action du réactif ne modifie pratiquement pas les spectres des solutions sériques des produits; le réactif de GROTE est donc sans action sur le T.S.S. et les composés voisins présents dans le sérum, tout au moins aux concentrations employées.

Puisque le réactif agit avec la fonction thione, nous devons donc admettre que cette fonction se trouve engagée dans la liaison avec les protéines sériques.

La bande située dans le visible, qui ne se trouve pas dans le spectre du O.S.S. et qui se modifie par la liaison avec les protéines ou par l'action du réactif de GROTE, pourrait être considérée comme caractéristique de l'état de la fonction thione.

Cette dernière hypothèse nous a conduit à rechercher d'éventuelles modifications du spectre du T.S.S. en solution dans le dimercaprol. De telles modifications pourraient traduire une possibilité de combinaison entre ces deux produits qui expliquerait l'inhibition par le B.A.L. de l'action diurétique du T.S.S. signalée au chapitre III.

Le spectre d'absorption du T.S.S. en solution dans le dimercaprol est représenté dans la figure suivante (figure V. 10.).

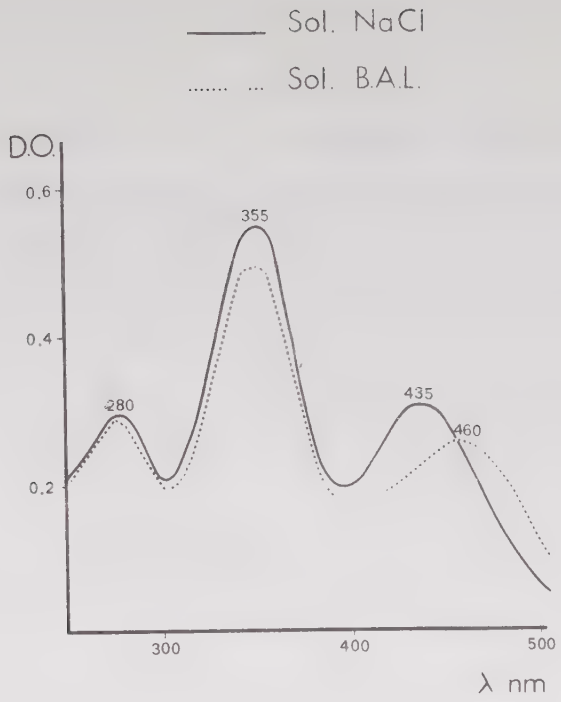


Figure V. 10. - *Spectres du T.S.S. en solution dans le soluté physiologique de NaCl et dans le dimercaprol.*

Ce spectre présente une grande similitude avec celui du T.S.S. en solution dans le sérum ou dans les solutés d'albumine. Selon notre hypothèse, il pourrait donc s'établir entre le T.S.S. et le dimercaprol une association du même type que celle que nous observons entre le T.S.S. et les protéines. Cette association se ferait par l'intermédiaire des groupements -SH du B.A.L. et de la fonction thione du T.S.S.. Dans un tel cas, le dimercaprol exercerait vis à vis du composé thionique un effet antagoniste par neutralisation. L'affinité du T.S.S. serait alors plus importante pour le B.A.L. que pour les protéines. Ceci ne peut constituer qu'une hypothèse dont la vérification sortirait du cadre de ce travail.

B. Dosage du T.S.S. sérique total.

Pour étudier quantitativement la liaison entre le T.S.S. et les protéines sériques, nous avons du établir des méthodes de dosage du produit sous ses formes libre et liée.

a) Technique.

L'étude spectrographique révèle deux possibilités de dosage à 355 et 455 nm. Chaque échantillon de sérum ne pouvant fournir son propre témoin, nous avons du choisir une longueur d'onde telle que l'absorption du T.S.S. soit relativement importante par rapport à celle du sérum. Le spectre d'absorption du sérum par rapport au soluté de NaCl à 9 g/l est représenté ci-dessous (figure V. 11.).

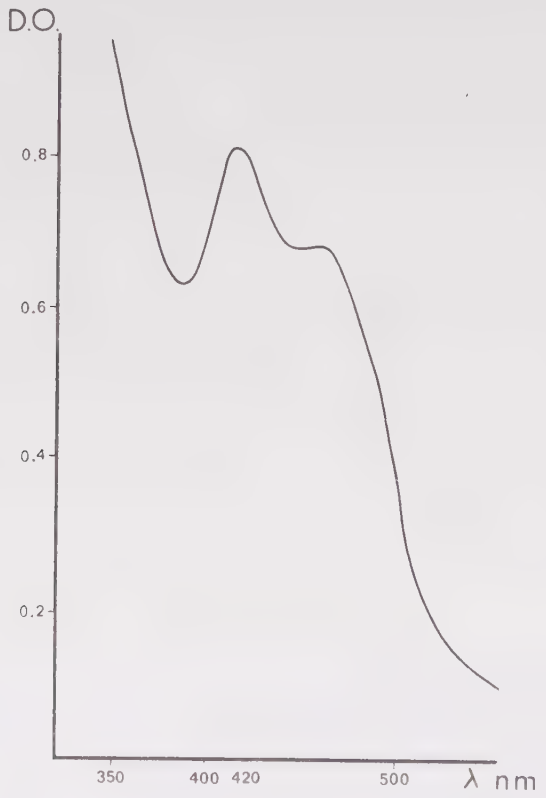


Figure V. 11. - *Spectre d'absorption du sérum humain par rapport au soluté physiologique de NaCl.*

Ce résultat nous a conduit à choisir la longueur d'onde de 455 nm.

Le dosage du T.S.S. sérique total s'opère sur des dilutions au 1/10ème dans du soluté de NaCl à 9 g/l, au moyen d'une gamme étalon réalisée à partir de mêmes dilutions du sérum recueilli pendant la phase de contrôle.

b) Résultats.

Six séries de dosages pratiqués sur des sérums de chiens recueillis au cours des expériences sur les clearances ont donné les résultats figurés dans le tableau suivant (tableau V. 7.).

Il apparaît que la concentration totale sérique du T.S.S. décroît moins rapidement que l'effet diurétique(cf. Tab. III.5.,IV.2,IV.3.).

C. Dosage du T.S.S. sérique libre.

a) Technique.

Pour doser le T.S.S. sérique libre, nous avons essayé une méthode spectrophotométrique utilisant la réaction de GROTE et une méthode d'équilibre de dialyse. Nous avons éprouvé ces deux techniques au moyen de solutions de T.S.S. dans du sérum humain.

- Méthode spectrophotométrique :

Nous opérons à 670 nm après action du réactif de GROTE, en utilisant comme témoin du sérum pur auquel est ajoutée la quantité de réactif. Seul le T.S.S. sous forme libre donne alors la réaction colorée.

Cependant, l'addition du réactif entraîne une modification du milieu qui provoque une augmentation de la quantité de T.S.S. libre d'autant plus importante que la proportion de réactif est plus élevée. Nous pouvons toutefois calculer la quantité de produit libre correspondant à une dilution nulle en extrapolant les droites qui représentent les variations de concentration du T.S.S. libre en fonction de la quantité de réactif de GROTE ajoutée à 5 ml de sérum contenant du produit.

Tableau V. 7.

Dosage du T.S.S. total dans le sérum de chien perfusé

	Diurèse saline isotonique		Diurèse aqueuse		Diurèse saline hypertonique	
Exp. N° →	3	6	10	15	11	18
Temps minutes	Résultats exprimés en µg/ml					
0 à 20	15	25	44	78	24	28
20 40	40	42	52	88	53	52
40 60	50	56	50	146	50	69
60 80	35	64	44	117	65	81
80 100	27	51	34	117	68	81
100 120	22	50	26	110	62	76

Exp. N° 3 : Chien mâle 17 kg - Perfusion de solution de NaCl à 9 g/l à la vitesse de 3,75 ml/mn
Exp. N° 6 : Chien femelle 12 kg - Perfusion de solution de NaCl à 9 g/l à la vitesse de 3,75 ml/mn

Exp. N° 10 : Chien mâle 16 kg - Perfusion de solution de glucose à 30 g/l à la vitesse de 5 ml/mn
Exp. N° 15 : Chien femelle 16 kg - Perfusion de solution de NaCl à 5,85 g/l à la vitesse de 5 ml/mn

Exp. N° 11 : Chien femelle 13 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 5 ml/mn
Exp. N° 18 : Chien mâle 14 kg - Perfusion de solution de NaCl à 30 g/l à la vitesse de 7 ml/mn

La dose de T.S.S. administrée était dans tous les cas de 25 mg/kg.

Ces droites sont représentées dans la figure suivante (figure V. 12. a et b).

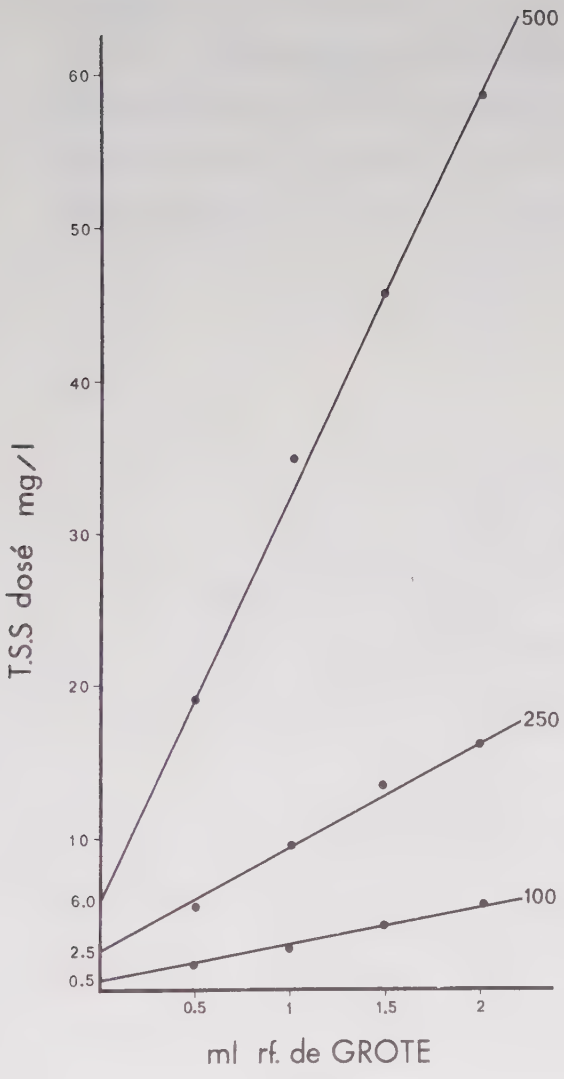


Figure V. 12. a.

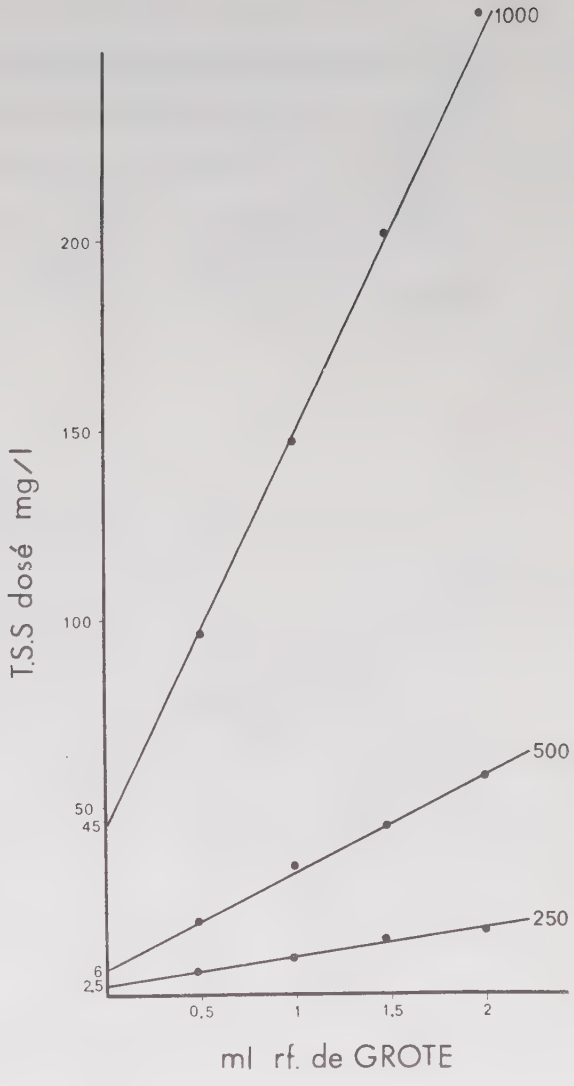


Figure V. 12. b.

Variations des concentrations du T.S.S. libre en fonction de la quantité de réactif de GROTE ajoutée à 5 ml de sérum pour différentes concentrations sériques du T.S.S. total (en mg/l).

- Méthode d'équilibre de dialyse :

Nous utilisons un appareillage automatique à flux continu (Autoanalyseur TECHNICON) comportant une unité de dialyse à 37 °C. La dialyse s'effectue contre du soluté physiologique de NaCl à 9 g/l et le dosage colorimétrique se pratique à 420 nm. Les étalons sont constitués par des solutions de produit dans du soluté de NaCl. Le montage original est schématisé ci-dessous (figure V. 13.).

Remarque : Le O.S.S. est dosé à 320 nm.

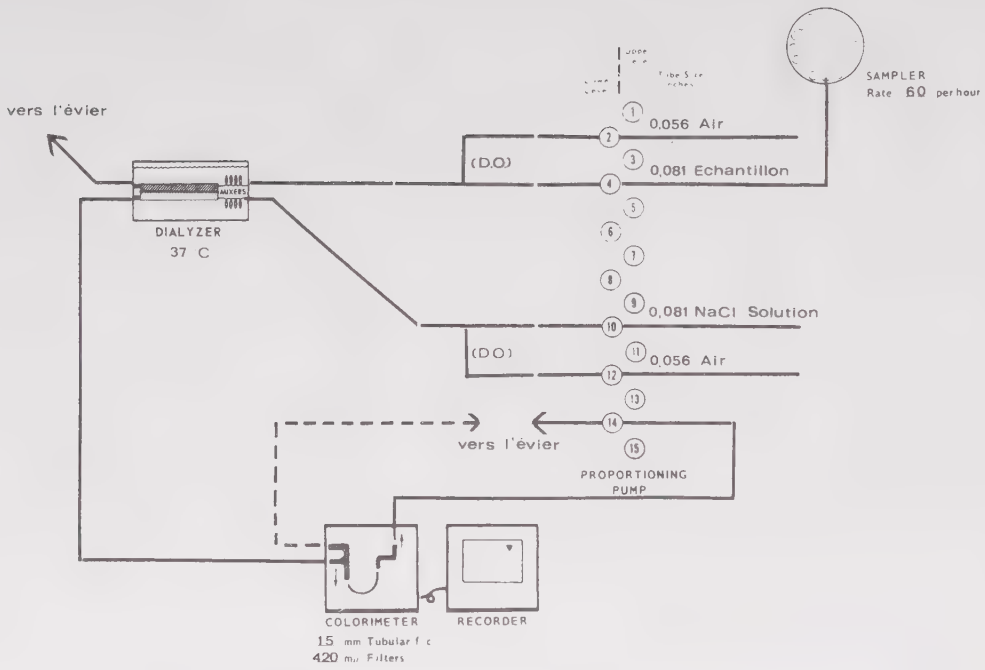


Figure V. 13. -

Schéma du montage utilisé pour le dosage par voie automatique des dérivés de la dithiole-thione à l'état libre dans le sérum.
Ce montage peut également s'employer pour le dosage des produits dans l'urine.
(Les indication chiffrées figurant sur les tubes de pompe représentent les diamètres intérieurs conventionnellement exprimés en pouces)

La pureté des produits ayant dialysé à partir des solutions protéiques a été vérifiée par spectrographie et par chromatographie.

Cette méthode fournit des résultats bien reproductibles (figure V. 14.).

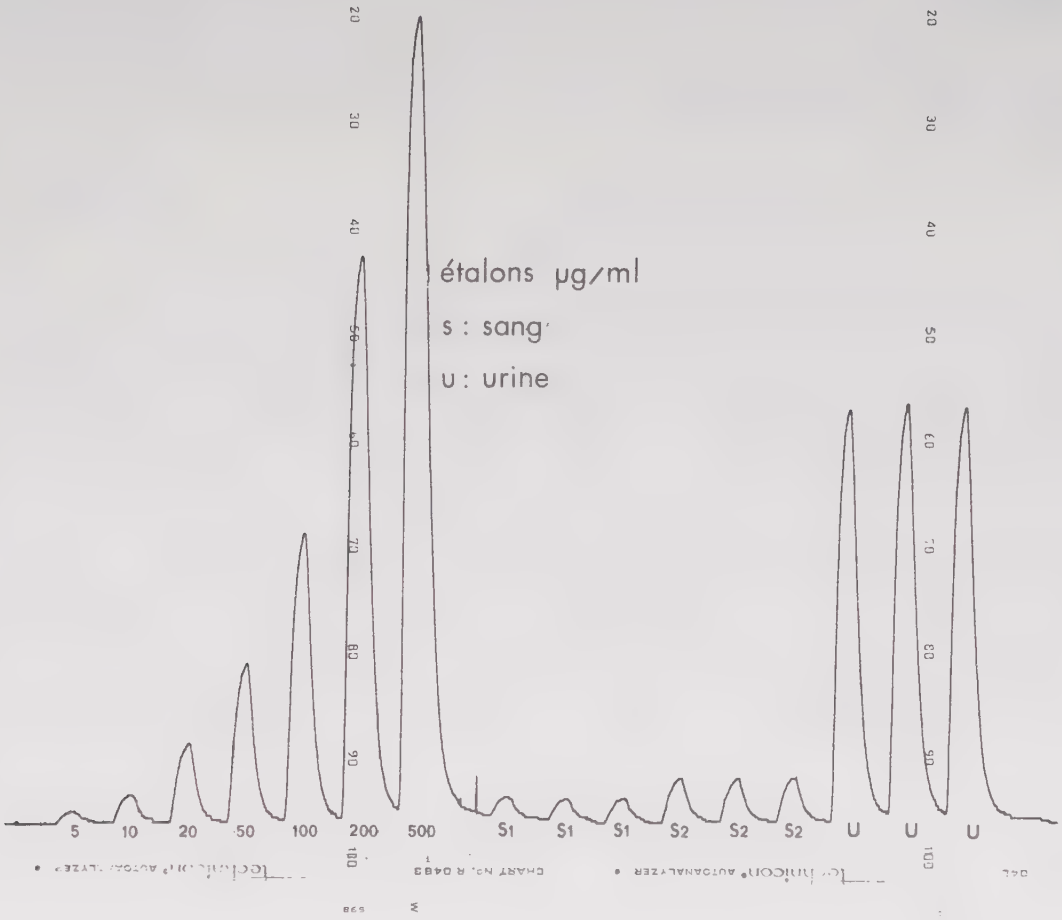


Fig. V. 14. - *Enregistrement des courbes de dosage du T.S.S. libre par voie automatique.*
Dosages sur des solutions-étalons et sur des échantillons de sérum et d'urine.

La comparaison des résultats fournis par les deux types de méthodes a permis de constater une excellente corrélation. Nous avons donc considéré que la méthode par équilibre de dialyse était parfaitement fiable et nous l'avons choisie, en raison de sa commodité, pour la suite de cette étude.

Nous avons dosé par cette méthode le T.S.S. libre et les autres produits de comparaison qui ont été précédemment signalés (O.S.S., T.C.S. et S.T.C.S.) en solution dans du sérum humain et dans des solutions d'albumine humaine et d'albumine bovine, pour différentes concentrations en produit solubilisé.

b) Résultats.

- Dosages dans le sérum humain et les solutions d'albumine :
(figures V. 15 et V. 16.)

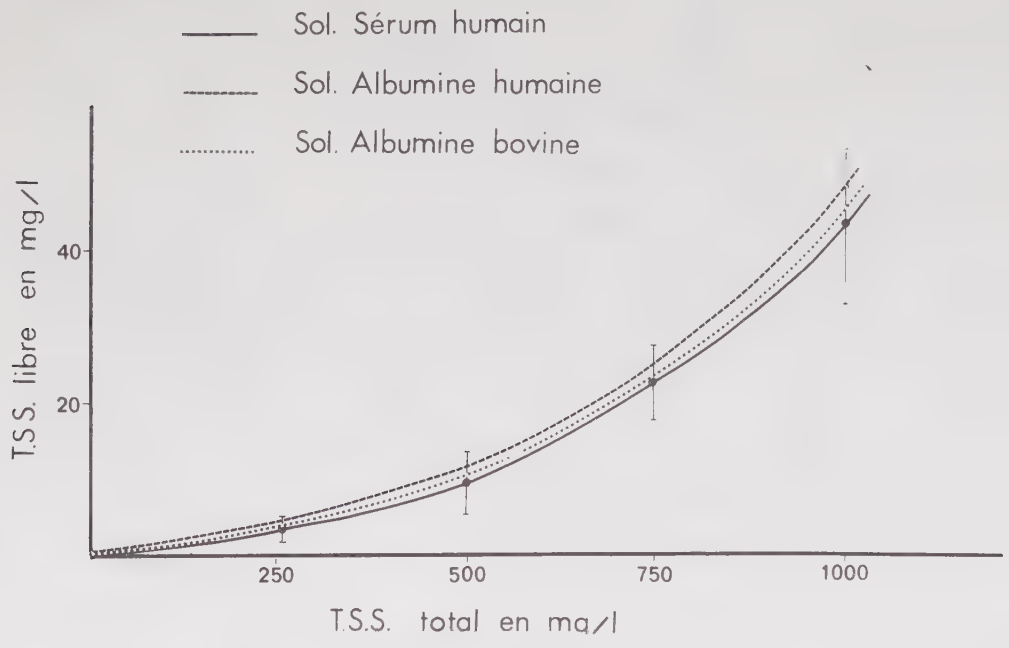


Fig. V. 15. - *Dosage du T.S.S. libre dans le sérum et dans des solutions d'albumine à 50 g/l dans du soluté physiologique de NaCl.*

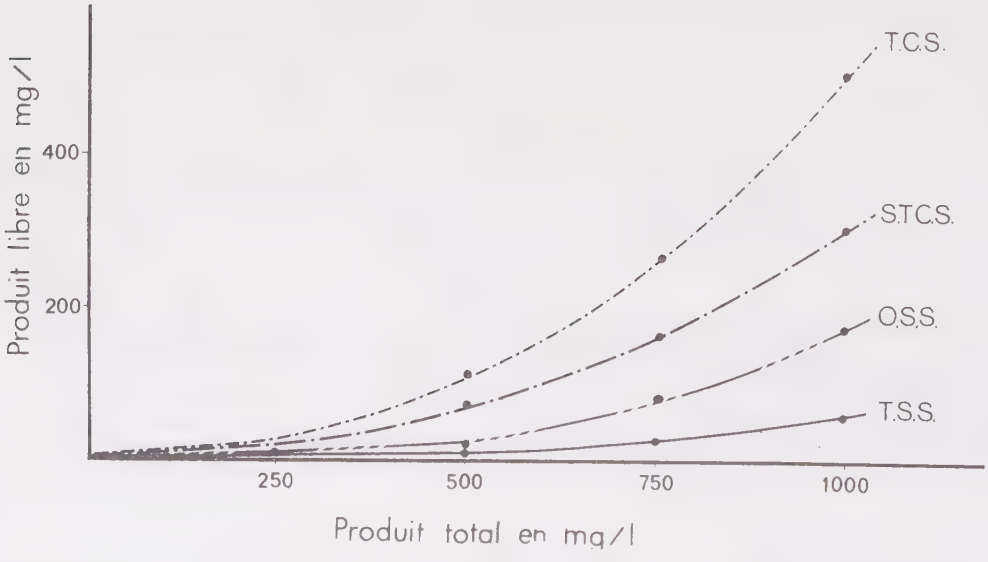


Fig. V. 16. - *Dosages du T.S.S., du O.S.S., du T.C.S. et du S.T.C.S. dans le sérum.*

- Dosage du T.S.S. libre dans le sérum de chien prélevé au cours des expériences de diurèse sous perfusion :

Les dosages par dialyse révèlent dans le sérum de chien des concentrations en T.S.S. libre comprises entre 1 et 8 µg/ml. Pour ces valeurs, la méthode utilisée ne se prêtait pas à un dosage précis; par ailleurs, les faibles quantités de sérum dont nous disposions ne permettaient pas de répéter les opérations pour calculer des valeurs moyennes. Nous nous dispensons par conséquent d'exposer le détail de ces résultats.

c) Discussion.

L'observation des courbes précédentes révèle que les concentrations du T.S.S. libre sont du même ordre de grandeur dans le sérum et dans les solutions d'albumine à concentration égale du produit solubilisé. Ceci démontre que ce sont principalement les albumines qui participent à l'association.

La courbe relative au T.S.S. (figure V. 15.) montre que pour une concentration totale de 10 mg/l la concentration de la fraction libre est très faible, insuffisante pour donner une coloration notable avec le réactif de GROTE.

La possibilité de liaison des autres composés est bien moindre, ce qui s'accorde avec leur faculté d'élimination rapide et leur incapacité à produire une action diurétique importante (v. Chap. III). Ce caractère peut être mis en relation avec l'existence et la réactivité de la fonction thione.

Remarque :

Nous avons vérifié que l'action dénaturante de l'acide trichloracétique (5 ml de sérum + 5 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 %) conduit à une surestimation de la concentration de la fraction libre. Cette valeur est trois fois plus élevée pour une concentration totale de 1000 µg/ml et dix fois plus élevée pour une concentration de 100 µg/ml.

D. Facteurs modifiant la liaison du T.S.S. avec les protéines.

L'importance quantitative de la liaison du T.S.S. avec les protéines sériques varie en fonction de la dilution du sérum et de son pH.

Les résultats relatifs aux études pratiquées in vitro sur du sérum humain aux pH 5,73 - 7,83 - 8,20 ainsi que sur des dilutions de sérum au 1/2 et au 1/5e avec du soluté de NaCl à 9 g/l sont exprimés par les courbes ci-dessous (figures V. 17. et V. 18.). La dilution avec de l'eau distillée conduit pratiquement aux mêmes résultats.

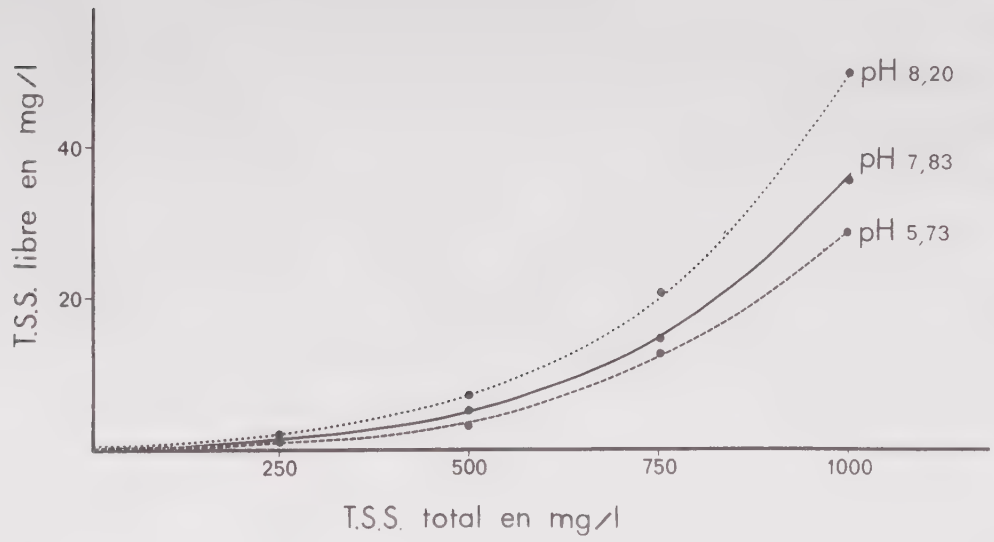


Fig. V. 17. - *Variation de la concentration sérique du T.S.S. libre en fonction du pH.*

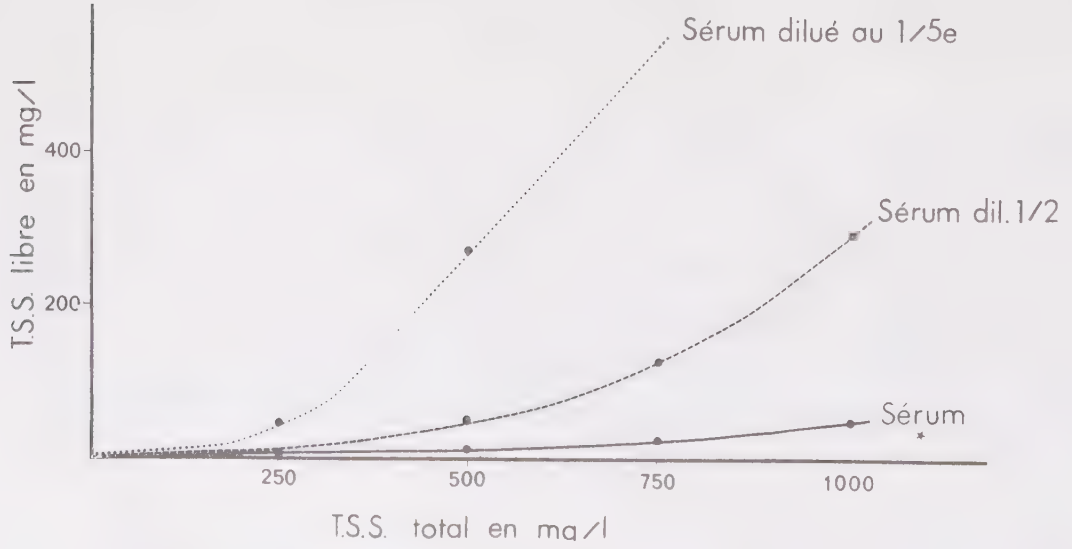


Fig. V. 18. - *Variation de la concentration sérique du T.S.S. libre en fonction de la dilution.*

E. Isothermes de liaison.

Les caractères qui viennent d'être définis permettent de considérer que l'association du T.S.S. avec l'albumine sérique s'effectue suivant une réaction réversible. Les modalités de cette association peuvent s'étudier à partir du tracé des isothermes de liaison de SCATCHARD (SCATCHARD 1949, AUSSEL et coll. 1973, PAUBEL et NIVIERE 1974).

a) Principe.

Soient une protéine P et une substance S qui peuvent s'associer suivant une réaction réversible.

Supposons que, dans les conditions expérimentales choisies, la molécule de protéine P possède N sites de liaison avec des molécules de S. Chaque site i possède une constante d'association k_i pour une molécule de S.

La loi d'action de masse conduit à une relation de la forme

$$\nu = \sum \frac{n_i \, k_i \, S_1}{1 + k_i \, S_1} \qquad \text{avec} \quad N = \sum n_i$$

où ν = nombre moyen de molécules de S fixées par molécule de protéine

$$= \frac{S_L}{P}$$

n_i = nombre de sites de liaison possèdant la constante d'association k_i vis à vis de S

S_1 = concentration molaire de S sous sa forme libre

S_L = concentration molaire de S lié à la protéine

P = concentration molaire de la protéine

La courbe représentative de la fonction $\frac{\nu}{S_1} = f(\nu)$

représente l'isotherme de liaison de SCATCHARD.

L'analyse mathématique de la courbe permet, dans certains cas, de calculer les valeurs n_i, k_i et N.

Lorsque l'isotherme est une droite, l'équation est de la forme

$$\frac{\nu}{S_1} = K (n - \nu)$$

K est la constante d'association. Il y a n sites de liaison tous identiques. La droite coupe l'axe des ordonnées pour une valeur de $\frac{\nu}{S_1} = Kn$ et l'axe des abcisses au point $n = \nu$.

b) Résultats.

Les isothermes de liaison obtenus à partir du T.S.S. et des produits de comparaison en solution dans l'albumine humaine sont représentés dans la figure ci-dessous (figure V. 19.).

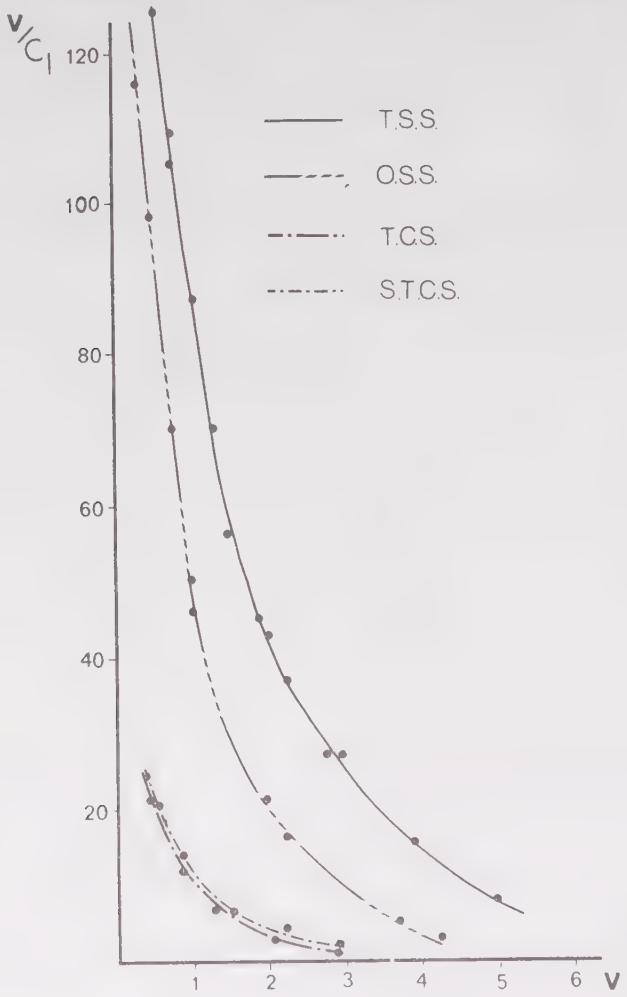


Fig. V. 19. - *Isothermes de liaison du T.S.S., du O.S.S., du T.C.S. et du S.T.C.S. avec l'albumine humaine (solution d'albumine à 50 g/ℓ dans du soluté physiologique de NaCℓ).*

c) Discussion.

La forme des courbes montre que l'association entre l'albumine et les dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 s'effectue suivant des modalités complexes faisant intervenir plusieurs sites de liaison indépendants.

L'analyse mathématique de ces courbes nécessiterait une étude exhaustive qui sortirait du cadre de ce travail.

En tout état de cause, il n'est pas exclu que la liaison avec les protéines rénales puisse se réaliser suivant des modalités comparables.

V. ETAT ET MODALITES DE TRANSPORT DU T.S.S. DANS LA BILE PENDANT LA PHASE D'ACTION DIURETIQUE.

De par sa nature chimique, le T.S.S. est susceptible de s'excréter dans la bile (ROBELET et GUERRIER 1966). Compte tenu de l'absence de produit dans les féces, il est également permis de penser que le produit excrété par la bile est ensuite réabsorbé au niveau de l'intestin suivant un "cycle entéro-hépatique". Les études autoradiographiques chez la souris témoignent de la vraisemblance de ces hypothèses.

Nous avons cherché à mettre en évidence ces possibilités chez le rat en utilisant du T.S.S. marqué.

1. ETUDE RADIOCHROMATOGRAPHIQUE DE LA BILE DE RAT.

A. Technique.

L'animal reçoit par voie intrapéritonéale 85 µCi de T.S.S. marqué. Il est ensuite anesthésié à l'uréthane.

La bile est prélevée par cathétérisation du cholédoque, trente minutes après l'administration du produit.

L'étude chromatographique est pratiquée dans les conditions habituelles, sur plaque de cellulose, en employant comme solvants l'isopropanol ammoniacal et le solvant de PARTRIDGE, à partir de 100 µl d'échantillon.

B. Résultats.

Avec les deux systèmes de solvants, les échantillons de bile produisent à distance de la ligne de départ des tâches jaunes ayant migré avec un Rf inférieur à celui du T.S.S. témoin en laissant une traînée jaunâtre, ainsi que des spots brunâtres aux points de dépôt. Les radiochromatogrammes permettent les mêmes observations.

Les Rf calculés à partir de six expériences présentent les valeurs suivantes pour les extrêmités des traînées :

	Isopropanol ammoniacal	Solvant de PARTRIDGE
Bile	0,48 ± 0,05	0,57 ± 0,06
T.S.S.	0,69 ± 0,07	0,73 ± 0,09

Ces Rf ont pratiquement les mêmes valeurs que ceux qui ont été fournis par les analyses chromatographique et radiochromatographique des urines recueillies entre la 48ème et la 72ème heure.

Nous n'avons pu caractériser les composés présents dans la bile. Nous avons cependant pu mettre en évidence du T.S.S.au niveau des tâches jaunes ayant subi la migration. Il est permis de penser que dans la bile du T.S.S. se trouve lié à une mucine. Dans ce milieu existent vraisemblablement divers catabolites accompagnant le T.S.S..

2. CINETIQUE DE L'EXCRETION BILIAIRE DU T.S.S. CHEZ LE RAT.

A. Technique.

Le rat de 200 g reçoit, par voie intraveineuse dans la veine du pénis, 10 mg de T.S.S. marqué (97 µCi) en solution dans du soluté de NaCl à 9 g/l.

La bile est prélevée par un cathétérisme du cholédoque.sur l'animal anesthésié à l'uréthane et recueillie toutes les quinze minutes dans le flacon servant au comptage. Dans chaque flacon on ajoute 15 ml de solvant Diotol, et on procède au comptage.

B. Résultats.

Les comptages fournissent les résultats suivants, exprimés en désintégrations par minute (d.p.mn.) :

Temps minutes	d.p.mn.	Temps minutes	d.p.mn.
0 - 15	68.682	105 - 120	88.569
15 - 30	414.940	120 - 135	75.712
30 - 45	283.651	135 - 150	75.410
45 - 60	214.766	150 - 165	69.060
60 - 75	129.059	165 - 180	65.530
75 - 90	110.009	180 - 195	64.839
90 - 105	89.748	195 - 210	34.300

L'excrétion biliaire du T.S.S. débute très rapidement; elle atteint son maximum quinze minutes environ après l'administration.

3. MISE EN EVIDENCE D'UN CYCLE ENTERO-HEPATIQUE CHEZ LE RAT.

La présence du produit marqué dans le foie, la bile et le tractus intestinal de la souris après administration par voie intraveineuse suggère l'existence d'un cycle entéro-hépatique. Nous avons cherché à révéler un tel processus chez le rat en pratiquant la méthode dite "des animaux croisés".

A. Technique.

Sur deux rats anesthésiés à l'uréthane on pratique un cathétérisme du cholédoque. Le cathéter évacuant la bile du premier animal est abouché à une anse duodénale du second rat dont la bile est recueillie dans les flacons servant au comptage.

Le premier rat reçoit, par voie intraveineuse dans la veine du pénis, 10 mg de T.S.S. marqué (97 µCi) en solution dans du soluté de NaCl à 9 g/l.

B. Résultats.

Les comptages fournissent les résultats suivants, exprimés en désintégrations par minute (d.p.mn.) :

Temps minutes	d.p.mn.	Temps minutes	d.p.mn.
0 - 15	237	105 - 120	1.422
15 - 30	224	120 - 135	1.699
30 - 45	476	135 - 150	2.127
45 - 60	765	150 - 165	1.495
60 - 75	1.113	165 - 180	1.470
75 - 90	1.267	180 - 195	1.028
90 - 105	1.291	195 - 210	965

L'excrétion biliaire du T.S.S. chez le second rat atteint son maximum environ 2 heures 30 minutes après l'administration du produit au premier animal. La présence de radioactivité dans la bile recueillie est un argument suffisant pour révéler l'existence d'un cycle entéro-hépatique.

4. DISCUSSION.

Le T.S.S. se trouve excrété dans la bile sous une forme dont la nature n'a pu être précisée. Il est probable que le produit est lié à une mucine. Différents catabolites accompagnent le T.S.S. dans le milieu biliaire.

Le composé et ses produits de transformation sont ensuite résorbés au niveau de l'intestin; ils sont repris par la circulation générale pour subir différents processus de fixation, de transformation et d'excrétion qui peuvent imposer de nouveaux passages par la voie biliaire.

Le métabolisme du T.S.S. passe donc par la voie d'un cycle entéro-hépatique.

VI. SECRETION RENALE DU T.S.S..

D'après les théories actuelles (WEINER et MUDGE 1964, PITTS 1970), le T.S.S., dérivé sulfonique polaire, est susceptible d'être sécrété au niveau du tubule proximal par l'intermédiaire du système de transport des acides, cette possibilité s'ajoutant à la filtration glomérulaire de la fraction du produit qui n'est pas liée aux protéines plasmatiques.

Or le pourcentage du T.S.S. libre dans le sang est très faible et nous pouvons estimer que la quantité excrétée est très supérieure à la quantité filtrée. Il faut donc admettre que le produit est en majeure partie sécrété au niveau du tubule proximal; la sécrétion reste en effet possible malgré la liaison avec les protéines, en raison de la réversibilité de l'association (GOLDSTEIN 1969).

Il est probable que la réabsorption tubulaire du T.S.S. est peu importante en raison de la faible valeur du pK_A du dérivé sulfonique qui impose un degré d'ionisation élevé en milieu tubulaire.

La répartition du produit dans un volume de distribution qui dépasse largement celui du plasma, sa capacité de liaison importante avec les protéines, sa rétention par divers organes dont le rein ainsi que le catabolisme qu'il subit enlèvent toute signification au calcul de la clearance rénale du T.S.S. (GOLDSTEIN 1969).

Pour révéler la possibilité de sécrétion tubulaire du T.S.S. nous avons étudié les modifications de son excrétion sous l'action du probénécide. Nous avons par ailleurs mesuré les variations de cette excrétion sous l'effet de l'acidose et de l'alcalose expérimentales.

1. ACTION DU PROBENECIDE SUR L'EXCRETION DU T.S.S. ET L'EFFET DIURETIQUE.

Le probénécide (Bénémide) est un acide faible sécrété au niveau du tubule proximal, qui inhibe le système de sécrétion des acides. Il diminue en particulier l'excrétion du P.A.H., des sulfamides et de la pénicilline. Cette dernière propriété a été mise à profit pendant la guerre pour prolonger la durée d'action de la pénicilline.

Le probénécide interviendrait en formant avec le transporteur cellulaire un composé stable et peu dissocié (BEYER 1950). Dans la mesure où le T.S.S. fait appel au même transporteur, sa sécrétion est susceptible d'être inhibée par le probénécide.

A. Technique.

Les expériences sont pratiquées chez le rat et chez le chien suivant les protocoles habituels. Chez le rat, les produits sont administrés per os en suspension dans du sirop simple. Chez le chien, les produits sont administrés par voie intraveineuse, en une seule prise, à une heure d'intervalle, de manière à pouvoir observer l'action du probénécide lorsque l'effet du T.S.S. est maximum.

Chez le rat, nous avons également étudié les effets propres du P.A.H. et de ses associations avec le T.S.S.. Chez le chien nous avons déterminé les clearances de l'inuline et du P.A.H..

Deux séries d'expériences ont été réalisées chez le rat, une seule chez le chien.

B. Résultats.

Les résultats sont exprimés dans les tableaux suivants (tableaux V. 8. et V. 9.).

Ils montrent que, dans tous les cas, le probénécide diminue l'excrétion du T.S.S. et l'action diurétique qui lui est associée.

C. Discussion.

L'expérimentation chez le rat montre que le probénécide réduit considérablement l'élimination du T.S.S. et ses effets diurétiques, tandis que le P.A.H. paraît sans influence sur l'excrétion et l'action du composé thionique.

Ni le probénécide, ni le P.A.H. ne semblent exercer d'action diurétique propre chez le rat.

Chez le chien, le probénécide exerce une action comparable. La clearance du P.A.H. diminue sous l'action du T.S.S.; sa diminution est encore plus importante après administration superposée de probénécide et sa valeur se rapproche de celle de la clearance de l'inuline. Ceci résulte de l'inhibition de la sécrétion tubulaire des acides.

Ces observations confirment que le T.S.S. est introduit dans le néphron par sécrétion tubulaire proximale utilisant le même mécanisme (ou le même transporteur) que le P.A.H.. Elles révèlent qu'il peut exister au niveau du système de transport un phénomène de compétition entre ces deux composés.

2. INFLUENCE DE L'ETAT ACIDO-BASIQUE SUR L'EXCRETION DU T.S.S..

Le pH du milieu biologique peut exercer deux types d'influence sur l'excrétion urinaire du T.S.S..

Il conditionne le degré d'ionisation du produit et par conséquent l'importance de la réabsorption tubulaire qui concerne uniquement la forme non dissociée. Il est cependant peu probable que les variations du pH aient une influence notable sur la réabsorption du T.S.S. en raison de la faible valeur de son pK_A qui impose un degré d'ionisation élevé pour toutes les valeurs des pH in vivo.

Le pH, comme nous l'avons précédemment signalé, conditionne également l'importance quantitative de la liaison avec les protéines, l'alcalinisation augmentant dans le sang la quantité de produit sous forme libre filtrable et favorisant par conséquent son élimination urinaire.

Quel que soit le mécanisme en cause, nous pouvons prévoir que l'élimination du T.S.S. sera favorisée dans les états d'alcalose expérimentale et contrariée dans les états d'acidose.

Au cours des expériences dans les états d'acidose et d'alcalose expérimentales chez le rat, nous avons déterminé les pourcentages de la dose qui ont été excrétés en 6 heures. Les résultats sont figurés dans le tableau suivant (tableau V. 10.). Ils sont conformes aux prévisions.

Tableau V. 8.

Influence du probénécide et du P.A.H. sur l'action diurétique du T.S.S. chez le rat.

Produits administrés per os en suspension dans 2 ml de sirop simple.pas de surcharge saline.

Produits Dose en mg/kg	Volume urinaire ml/kg/6 h	Elimination ionique en µEq/kg/6 h			Elimination du T.S.S.	
		Cl^-	Na^+	K^+	ug/kg/6 h	% dose
Témoin	10,0	368	52	305	-	-
Probénécide : 200	14,5	368	74	270	-	-
P.A.H. : 200	9,5	333	48	238	-	-
T.S.S. : 50	20,0	1945	1410	719	5922	12,0
T.S.S. : 200	44,7	6169	5676	1967	21000	10,5
TSS:50 + Probénécide:200	10,1	283	192	131	1717	3,5
TSS:200 + Probénécide:200	19,5	2438	1988	995	11700	5,8
T.S.S.:50 + P.A.H.:50	20,1	1869	1386	985	8643	17,3
T.S.S.:200 + P.A.H.:200	37,4	5049	4600	1870	18700	9,3

Moyenne obtenue à partir de deux expériences

Tableau V. 9.

Influence du probénécide sur l'action diurétique du T.S.S. chez le chien.

Temps minutes	V ml/mn	$U_{Na} \times V$ µEq/mn	C_{In} ml/mn	C_{PAH} ml/mn	$U_{TSS} \times V$ µg/mn
-60 à -40	0,7	25	26,2	76	-
-40 -20	0,9	35	24,7	74	-
-20 0	1,0	45	27,0	72	-
Administration de T.S.S. 25 mg/kg par voie intraveineuse					
0 20	2,5	307	26,5	62	44
20 40	3,0	375	25,7	55	843
40 60	3,0	426	24,7	50	787
Administration de probénécide 200 mg/kg par voie intraveineuse					
60 80	2,8	409	24,3	44	483
80 100	1,4	343	24,1	28	322
100 120	0,7	160	21,8	24	161

Exp. N° 14 : Chien mâle 17 kg

$U_{TSS} \times V$: Excrétion du T.S.S. en ug/minute

Tableau V. 10.

Pourcentage de la dose de T.S.S. éliminé en 6 heures au cours des expériences dans les états d'acidose et d'alcalose expérimentales chez le rat.

Acidose				Alcalose			
50 mg/kg		100 mg/kg		50 mg/kg		100 mg/kg	
pH	% éliminé	pH	% éliminé	pH	% éliminé	pH	% éliminé
6,15	24	6,00	37	7,20	47	6,85	40
6,10	25	5,95	39	7,90	57	7,10	50
6,25	35	6,25	40	8,00	58	7,20	60
6,20	32	6,35	45	7,75	47	7,15	60
Moyenne =	29		40		52		52

Valeurs moyennes chez le rat en état normal : 50 mg/kg 45 %
100 mg/kg 46 %

VII. CONCLUSIONS.

Quelle que soit la voie d'administration, le T.S.S. est résorbé dans le milieu sanguin où il se lie aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine, qui assurent son transport dans le courant circulatoire. Il se lie par son groupement CS nucléophile.

Il se trouve retenu par différents tissus et organes au premier rang desquels le foie et le rein.

Au niveau du foie, le T.S.S. subit un catabolisme qui n'affecte qu'une partie du produit. Parallèlement, le composé et ses dérivés de transformation sont excrétés dans la bile, puis réabsorbés au niveau de l'intestin et repris par la circulation générale, suivant un cycle entéro-hépatique. Seule une quantité minime s'élimine dans les fécès.

Une faible partie du T.S.S. qui n'est pas liée aux protéines plasmatiques est filtrée au niveau du glomérule, tandis que la majeure partie est introduite dans le néphron par sécrétion tubulaire proximale faisant appel au système d'excrétion des acides. Cette sécrétion s'effectue suivant les mêmes modalités que celle du P.A.H., vraisemblablement par l'intermédiaire d'un transporteur commun.

L'action diurétique s'exerce au cours de l'excrétion rénale du T.S.S. non transformé, c'est à dire principalement durant la première heure qui suit l'administration du produit. Son intensité est en relation avec l'importance de la concentration plasmatique du produit et de sa fixation dans la partie externe de la zone médullaire. La cinétique de la diurèse est parallèle à celle de l'élimination du produit.

L'excrétion du T.S.S. diminue rapidement et devient négligeable au bout de quelques heures, et l'action diurétique est épuisée alors que la moitié seulement du produit administré a été éliminée.

La fraction du T.S.S. retenue par l'organisme subit, principalement au niveau du foie qui possède un équipement enzymatique important, une dégradation catabolique affectant le cycle dithiole-thione.

Le soufre entrant dans la constitution du produit se trouve incorporé dans la peau, les sécrétions, les disques intervertébraux, les cartilages de conjugaison et, en règle générale, dans tous les mucopolysaccharides acides (chondroïtine-sulfates). Il s'intègre, sous différentes formes, dans le "cycle biologique du soufre" et participe à l'élaboration des divers composés soufrés de l'organisme avant de s'éliminer in fine à l'état de sulfate. De nombreux médicaments et produits soufrés subissent un métabolisme comparable (FROMAGEOT 1946, AWAPARA 1956, GUINNEBAULT et coll. 1956, HIRTZ 1968).

La transformation du T.S.S. semble débuter dès son introduction dans l'organisme.

Il est probable que, dans la molécule du T.S.S., c'est principalement le cycle dithiole-thione qui subit une dégradation. En effet, le noyau thiophénique manifeste dans l'organisme une certaine stabilité (CHANAL et coll. 1973), bien que susceptible de se transformer partiellement en éthyl mercaptan (BLICKE 1952).

C'est la réactivité de la fonction thione au sein du groupement dithiole-thione qui assure principalement la fixation du produit sur les protéines du sang et des différents organes. En effet, les autres composés voisins, moins "réactifs" que le T.S.S., manifestent pour les protéines une affinité moindre et s'éliminent rapidement en proportion élevée sans produire d'action diurétique importante.

Il a été signalé que le (méthoxy-4 phényl)-5 dithiole-1,2 thione-3 restait en partie fixé par l'organisme, mais les modalités de cette rétention n'ont pas été définies (VON GMELIN et LAGLER 1961).

Il est permis de penser que tous les composés appartenant à la série des dithiole-thiones subissent un métabolisme qualitativement comparable à celui du T.S.S..

La Pharmacocinétique du T.S.S. peut s'exprimer par le schéma suivant (figure V. 20.).

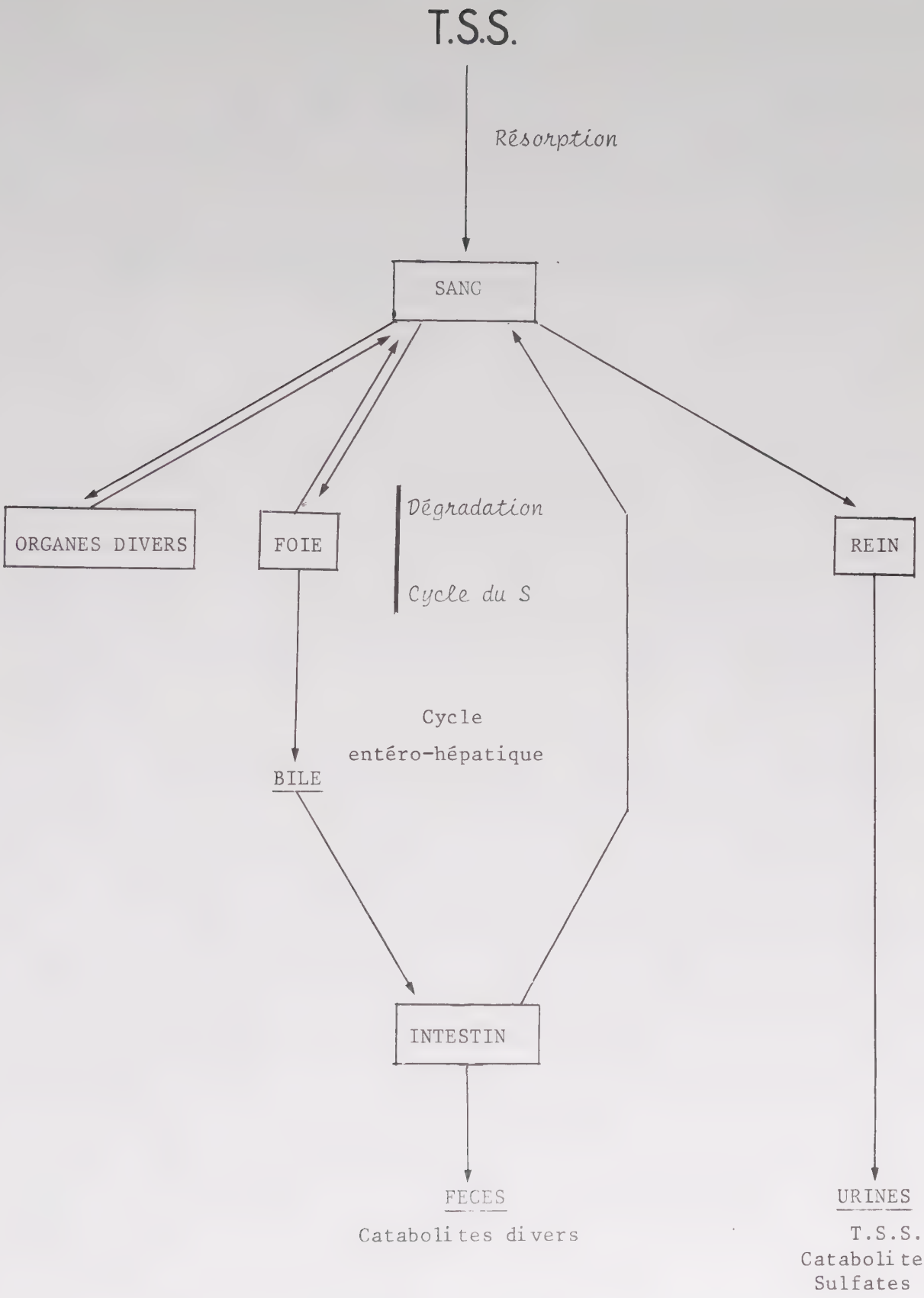


Fig. V. 20. - *Schema du métabolisme du T.S.S..*

C H A P I T R E V I

ACTION ET LOCALISATION DU T.S.S. AU NIVEAU CELLULAIRE HEPATIQUE ET RENAL.

Seuls sont bien connus les mécanismes d'action cellulaire des diurétiques inhibiteurs enzymatiques ou hormonaux (inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, de l'aldostérone, de l'A.D.H.). Pour la majeure partie des diurétiques, ces modalités restent hypothétiques. Les causes d'action les plus fréquemment invoquées sont la diminution d'apport ou d'utilisation de l'énergie nécessaire à la réabsorption, et la fixation du produit au niveau des protéines membranaires ou de transport (voir Chapitre I).

Les relations entre l'activité diurétique et l'action inhibitrice vis à vis de l'ATPase Na-K ont été précédemment exposées. Seuls les effets diurétiques de la ouabaïne paraissent résulter d'une inhibition de cet enzyme. L'ensemble des travaux révèle un défaut de corrélation entre l'activité diurétique et l'action inhibitrice vis à vis de l'ATPase Na-K (LANDON et NORRIS 1965, EBEL et coll. 1972).

Néanmoins, par souci de comparaison, il nous a paru intéressant d'étudier l'action du T.S.S. sur l'activité ATPasique rénale.

Nous avons également cherché à localiser les produits au niveau des structures cellulaires rénales et hépatiques au moyen d'une méthode histoautoradiographique utilisant du T.S.S. et du O.S.S. marqués.

Nous avons enfin recherché la possibilité d'une action inhibitrice sur la réabsorption active du chlorure en ayant recours à la branchie d'anguille marine.

I. ACTION DU T.S.S. SUR L'ACTIVITE ATP-ASIQUE RENALE.

1. TECHNIQUE.

Dans les cellules rénales se trouvent l'ATPase Na-K localisée principalement au niveau de la membrane basale des cellules tubulaires proximales (KINNE et SCHMITZ 1971) et l'ATPase Mg dont la répartition est plus uniforme.

Plusieurs techniques permettent le dosage de l'activité ATPasique Na-K (LOWRY 1953, DUBACH 1953, DUBACH et SCHMIDT 1971, DE SANTO et HIERHOLZER 1971). Elles font appel à des ultramicrométhodes et leur mise en oeuvre ne peut se faire que dans des laboratoires spécialisés.

Notre ambition se limitant à une approche du problème, nous avons recouru à la méthode histochimique de WACHSTEIN (WACHSTEIN 1955, WACHSTEIN et MEISEL 1957) qui permet de révéler l'activité ATPasique Mg et Na-K au niveau des structures cellulaires. Cette technique manque de spécificité et ne révèle qu'imparfaitement l'activité ATPasique Na-K par suite de l'action inhibitrice des ions plomb (SCHMIDT et DUBACH 1971). Nous l'avons néanmoins retenue en raison de sa simplicité, considérant par ailleurs que l'intérêt relatif à notre étude ne justifiait pas la mise en oeuvre de techniques plus élaborées.

L'expérimentation a été réalisée sur des rats blancs wistar de poids moyen 200 g, suivant le protocole habituel.

Une heure après l'administration des surcharges et des produits, les animaux sont sacrifiés et les reins sont immédiatement prélevés puis coupés au microtome à congélation.

Dans la technique de WACHSTEIN, la coupe fixée sur une lame est placée en incubation à 37 °C dans une solution tamponnée à pH 7,2 contenant un substrat d'adénosine-triphosphate et de nitrate de plomb. Le phosphate libéré par l'action enzymatique précipite in situ sous forme de phosphate de plomb. Après élimination par lavage de l'excès de plomb soluble, la coupe est soumise à l'action du sulfure d'ammonium qui amène le plomb précipité à l'état de sulfure de plomb noir.

L'existence d'une activité ATPasique se traduit au niveau des structures cellulaires par une teinte allant du brun au noir.

Dans le but de déceler certaines possibilités d'artefact, nous avons parallèlement révélé les activités phosphatasiques acide par la technique de GOMORI (selon GABE 1968) qui s'apparente à celle de WACHSTEIN. Selon cette méthode, la coupe histologique est placée en incubation dans une solution tamponnée à pH 5 contenant un substrat de glycérophosphate et du nitrate de plomb. Le précipité de phosphate de plomb est révélé au moyen du sulfure d'ammonium comme dans la technique précédente.

L'étude a été réalisée à partir de T.S.S., de O.S.S., de furosémide, d'hydrochlorothiazide et d'acétazolamide.

2. RESULTATS.

Les résultats obtenus à partir du T.S.S. s'expriment par les clichés représentés sur la Planche VII.

L'activité enzymatique se traduit par la coloration foncée observée sur la paroi tubulaire et qui paraît occuper la totalité de la lumière.

A. Activité ATPasique.

Les résultats obtenus à partir des coupes de reins d'animaux témoins montrent que l'activité ATPasique est surtout marquée dans la zone médullaire externe.

Sous l'action du T.S.S., l'activité enzymatique se trouve considérablement diminuée dans la zone corticale et pratiquement abolie dans la zone médullaire externe. Des résultats comparables, quoique moins marqués, s'observent à partir du O.S.S. (résultats non figurés).

Sous l'action des autres produits essayés (furosémide, hydrochlorothiazide, acétazolamide), aucune modification notable de l'activité ATPasique n'est mise en évidence par la technique utilisée (résultats non figurés).

B. Activité phosphatasique acidè.

Par rapport aux témoins, l'activité phosphatasique acide ne paraît affectée par aucun des produits essayés.(Seuls sont figurés les résultats se rapportant à un rein témoin et à un rein d'animal ayant reçu du T.S.S..)

3. DISCUSSION.

La comparaison des résultats fournis par les deux types de méthodes révèle que les modifications observées sous l'effet du T.S.S. et du O.S.S. sur les coupes traitées selon la technique de WACHSTEIN traduisent une diminution de l'activité ATPasique, en dehors de toute réaction entre les produits essayés et les réactifs.

L'importance de l'inhibition de l'activité enzymatique permet de penser que l'ATPase Na-K subit également l'action des produits.

Cette réduction de l'activité ATPasique ne peut être tenue pour totalement responsable de l'action diurétique du T.S.S. puisqu'elle est également produite par le O.S.S. qui n'est que faiblement actif.

L'ATPase n'agit que si ses groupements -SH sont libres (SKOU 1963, JAVILLIER et coll. 1964). Les effets produits par le T.S.S. et le O.S.S. pourraient donc s'expliquer par la possibilité d'association des produits avec les protéines enzymatiques par l'intermédiaire de leurs groupements -SH. Certains composés thioliques paraissent inhiber l'activité ATPasique suivant ce processus (DUGGAN et NOLL 1972). Cette observation accrédite l'hypothèse que nous avons déjà formulée selon laquelle les dérivés de la dithiole-thione s'uniraient aux protéines par l'intermédiaire de leurs fonctions thiol. La vérification expérimentale de ce mode d'action à partir du dosage in situ des groupements -SH ne peut s'opérer dans le cas présent car les dérivés de la dithiole-thione se comportent comme des thiols vis à vis des réactifs utilisés.

De nombreux travaux font état de la possibilité de liaison des diurétiques avec les protéines rénales, enzymatiques ou autres, par l'intermédiaire des groupes sulfhydrile.

PLANCHE VII

COUPES DE REINS DE RATS TRAITES SELON LES TECHNIQUES DE WACHSTEIN ET DE GOMORI
après administration de T.S.S. et de O.S.S. marqués (G : 10x10)

Fig 1 : TEMOIN - 1 HEURE - TECHNIQUE DE WACHSTEIN

L'activité ATPasique se manifeste dans la zone corticale (C) principalement au niveau des glomérules, et dans la zone médullaire externe (ME) où elle est très marquée. Elle paraît absente dans la zone médullaire interne (MI).

Fig 2 : T.S.S. MARQUE - 1 HEURE - TECHNIQUE DE WACHSTEIN

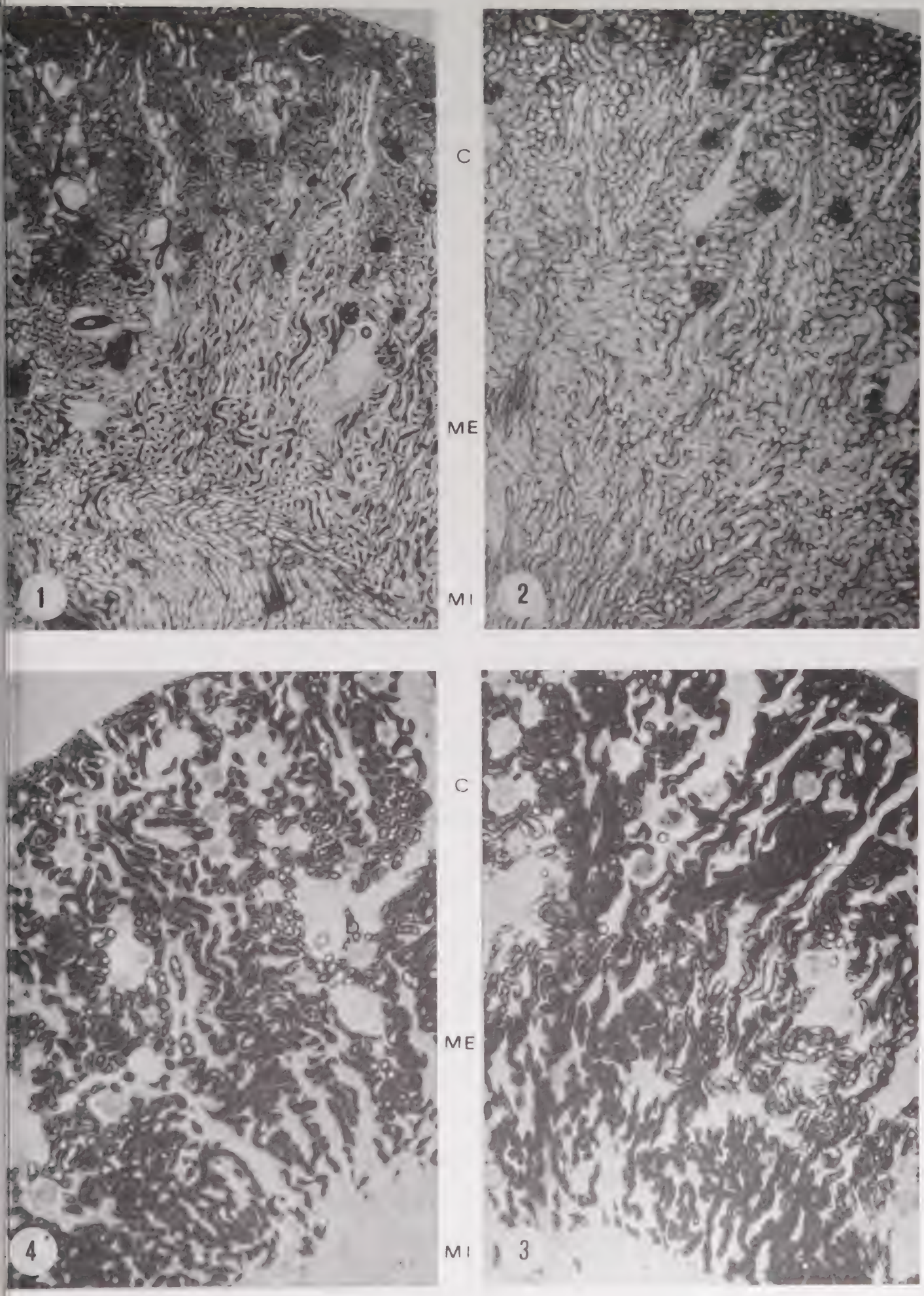
L'activité ATPasique a pratiquement disparu, excepté au niveau des glomérules et de la partie externe de la zone corticale.

Fig 3 : TEMOIN - 1 HEURE - TECHNIQUE DE GOMORI

L'activité phosphatasique acide se manifeste dans les zones corticale et médullaire.

Fig 4 : T.S.S. MARQUE - 1 HEURE - TECHNIQUE DE GOMORI

L'activité phosphatasique acide est conservée dans les zones corticale et médullaire.


C
ME
MI
1
2
4
3

CAFRUNY et coll. (1955), CAFRUNY et FARAH (1956) ont mis en évidence une diminution de la quantité de groupements -SH dans le tissu rénal du chien sous l'effet du mersalyl. D'autres composés mercuriels diurétiques produisent le même effet, mais il faut noter que certains dérivés mercuriels non diurétiques, comme le parachloromercuribenzoate, peuvent aussi s'unir aux groupes sulfhydrile (KESSLER et coll. 1957).

KOMORN et CAFRUNY (1965) ont mis en évidence le même phénomène dans les reins de chiens traités avec l'acide éthacrynique. LANDON et FITZPATRICK (1970) ont observé le même effet sous l'action du chlorothiazide et du furosémide. Ces auteurs ont d'ailleurs suggéré que les diurétiques agiraient principalement en modifiant la perméabilité aux ions de la membrane cellulaire, par leur interaction avec les groupements -SH de protéines susceptibles d'intervenir dans les transports, qui représenteraient 5 % des protéines membranaires.

L'inhibition de l'activité ATPasique pourrait n'être alors qu'un phénomène accessoire, en relation avec la possibilité de liaison des diurétiques avec les groupements sulfhydrile, qui interviendrait secondairement dans la genèse de l'action diurétique.

Dans le cas des dérivés de la dithiole-thione, nous avons établi une relation entre la capacité de liaison avec les protéines (sériques et rénales) et l'activité diurétique. Nous avons par ailleurs des raisons de penser que leur liaison avec les protéines se fait par l'intermédiaire de leurs groupements -SH, ce mode d'association ayant pour effet l'inhibition de l'activité ATPasique. Nous avons également montré que le T.S.S. se fixait pendant l'action diurétique au niveau de la zone médullaire externe.

Au terme de ces considérations, nous pouvons formuler l'hypothèse d'action des dérivés de la dithiole-thione: ces produits agiraient principalement en diminuant la perméabilité aux ions de la paroi de l'anse de HENLE; cette action résulterait de leur union avec les protéines membranaires responsables de la perméabilité de diffusion ou du transport, union qui s'établirait par l'intermédiaire des groupements -SH de ces protéines. Cette hypothèse s'accorde avec l'interprétation de LANDON et FITZPATRICK (1970) sur le mode d'action du furosémide et des diurétiques dans leur ensemble.

II. LOCALISATION CELLULAIRE DU T.S.S. ET DU O.S.S. MARQUES DANS LE REIN ET LE FOIE DE RAT - ETUDE HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE.

1. TECHNIQUE.

Les produits marqués sont administrés dans les mêmes conditions que pour l'étude macroautoradiographique (100 µCi environ par rat).

Les reins et le foie sont prélevés 45 minutes plus tard et coupés au microtome à congélation. Les coupes de 6 µm d'épaisseur sont recueillies sur plaques de verre et recouvertes d'une couche d'émulsion liquide ILFORD G5. Après séchage de l'émulsion, les coupes sont placées dans des boîtes à histologie, à l'obscurité et au froid. Après un temps suffisant, les lames sont développées (Révélateur D19 KODAK). Elles sont ensuite colorées à l'hémalun de MAYER 15 minutes puis décolorées à l'alcool chlorhydrique (Alcool 70°-HCl N : 96/4) pendant quelques minutes.

A partir de ces coupes nous réalisons des clichés photographiques sur lesquels la radioactivité se manifeste sous l'aspect de zones blanches (comme dans le cas de l'étude macroautoradiographique).

2. RESULTATS.

Les résultats représentant des coupes de reins et de foies d'animaux ayant reçu du T.S.S. et du O.S.S. marqués sont figurés sur la Planche VIII.

Nous avons vérifié que les coupes d'organes d'animaux témoins ne présentaient aucune réduction de l'émulsion.

Les résultats observés au faible grossissement (Fig. I et II) confirment ceux qui ont été apportés par les méthodes macroautoradiographiques à partir des coupes de reins. Le T.S.S. se trouve localisé dans les zones corticale et médullaire externe, et le O.S.S. est peu fixé par l'organe.

Au fort grossissement, il apparaît que la radioactivité se retrouve principalement dans la lumière tubulaire (Fig. III et IV).

PLANCHE VIII

HISTOAUTORADIOGRAPHIES DE COUPES SAGITTALES DE REINS ET DE FOIES DE RATS sacrifiés 45 minutes après administration de T.S.S. et de O.S.S. marqués au ^{35}S

Fig 1 - COUPE DE REIN - T.S.S. - G : 4 x 10

La présence de produit s'observe dans les zones corticale (C) et médullaire (ME et MI).

Fig 2 : COUPE DE REIN - O.S.S. - G : 4 x 10

La présence du produit ne s'observe que dans la partie externe de la zone corticale.

Fig 3 : COUPE DE REIN DANS LA ZONE MEDULLAIRE EXTERNE - T.S.S. - G : 10 x 10

La présence du produit s'observe principalement à l'intérieur de la lumière tubulaire.

Fig 4 : COUPE DE REIN DANS LA ZONE MEDULLAIRE EXTERNE - O.S.S. - G : 10 x 10

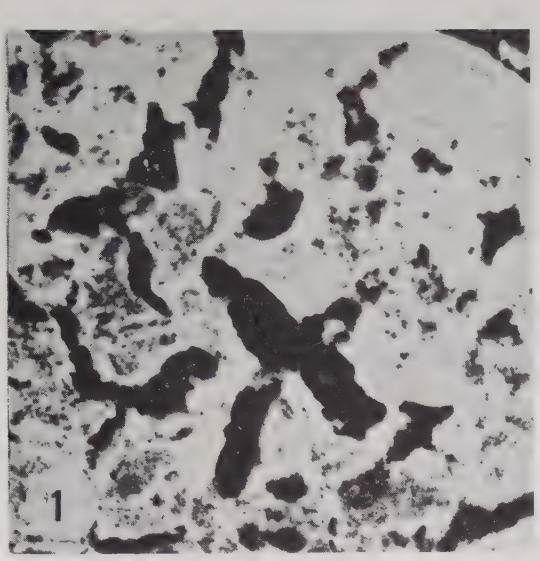
Le produit est pratiquement absent.

Fig 5 : COUPE DE FOIE - T.S.S. - G : 40 x 10

Le produit est présent à l'intérieur des cellules.

Fig 6 : COUPE DE FOIE - O.S.S. - G : 40 x 10

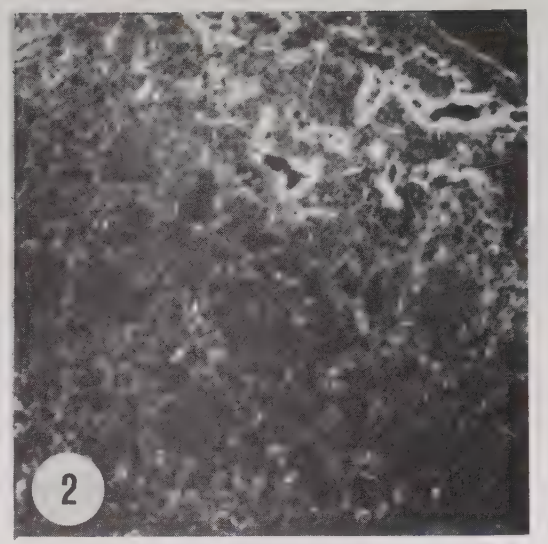
Le produit se trouve également à l'intérieur des cellules, mais en quantité moindre.

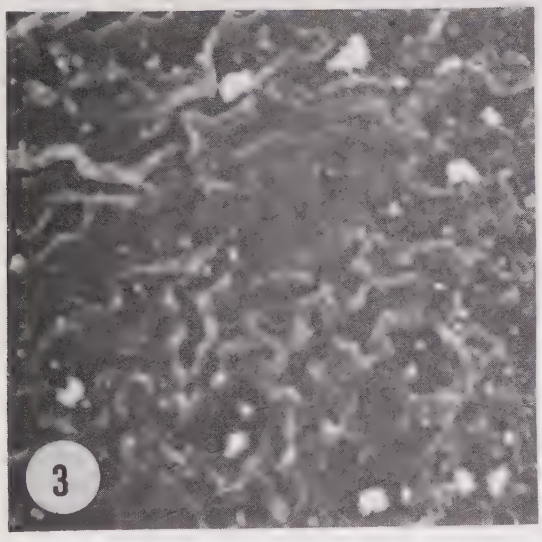


C

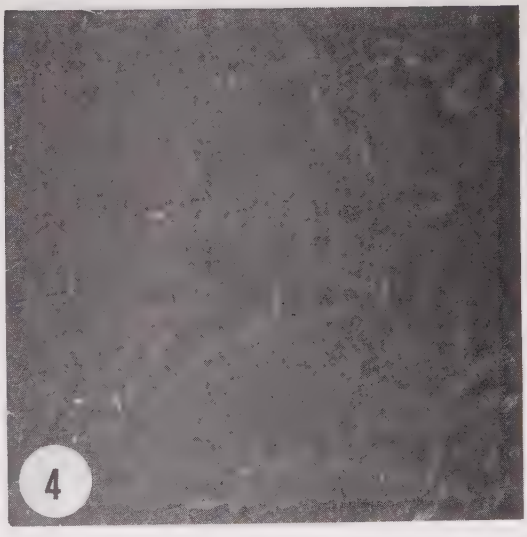
ME

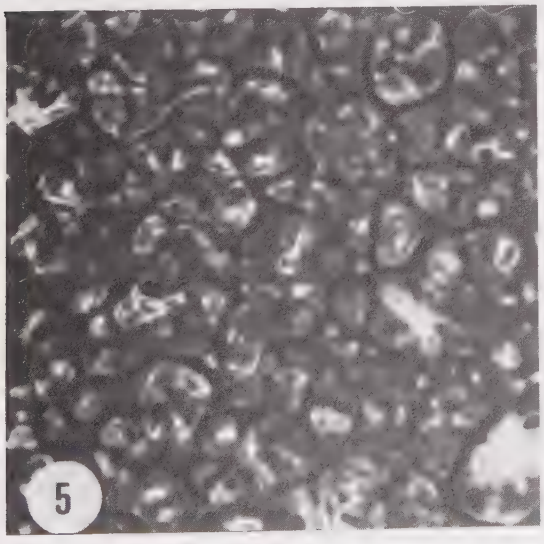
MI

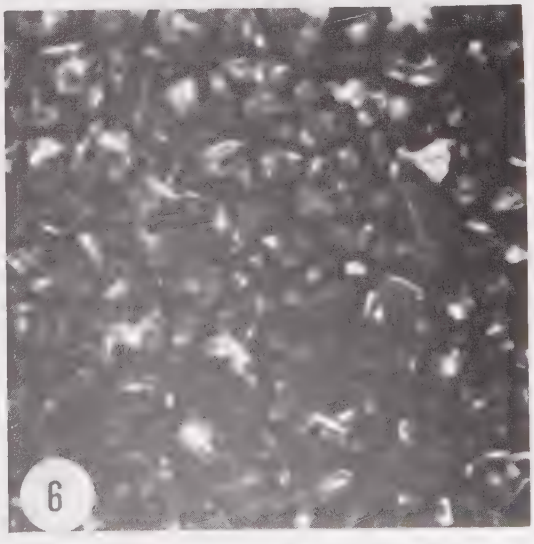




MI







Sur les coupes de foie, la localisation intracellulaire de la radioactivité apparaît nettement pour les deux produits essayés (Fig. V et VI).

3. DISCUSSION.

Ces résultats confirmrnt les observations antérieures mais ne fournissent guère de précisions sur la localisation cellulaire des produits.

L'échec relatif de cette méthode résulte des conditions expérimentales. En effet, au cours de la manipulation, les produits ont été en partie élués et déplacés du fait de leur solubilité dans les milieux aqueux et de la labilité de leurs associations avec les protéines.

En tout état de cause, la mauvaise qualité de ces préparations interdit toute interprétation exhaustive.

III. ACTION SUR LE TRANSPORT ACTIF DU CHLORE.

La possibilité d'existence d'une "pompe à chlore" au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE a été révélée par les travaux de BURG et GREEN (1973 b) et de ROCHA et KOKKO (1973).

BURG et coll. (1973) estiment que l'action du furosémide résulte principalement d'une inhibition de la réabsorption du chlorure dans le segment de dilution de la branche ascendante.

Selon MAETZ (1971) l'extrusion du sodium dans l'eau de mer au niveau de la branchie de téléostéen marin s'opère contre un gradient chimique, tandis que celle du chlore s'effectue contre des gradients électrique et chimique; l'extrusion de l'ion chlorure est donc un phénomène de transport actif. Le rejet des ions dans le milieu marin extérieur s'effectuerait suivant deux processus : un processus de diffusion par échange (exchange-diffusion) résultant du couplage des flux entrant et sortant quantitativement plus important, et un processus d'échange contre d'autres ions (net extrusion) quantitativement peu important.

Dans le cas du sodium, ce dernier processus est stimulé par la présence de K^+ dans le milieu extérieur et semble requérir l'intervention de l'ATP-ase Na-K.

En mesurant le passage dans le milieu extérieur de NaCl marqué au moyen de ^{36}Cl et de ^{24} ou ^{22}Na, EPSTEIN et coll. (1973) ont montré que chez l'anguille (anguilla anguilla) adaptée à l'eau de mer l'extrusion du Cl^- était considérablement réduite chez l'animal ayant reçu du thiocyanate de sodium, alors que celle du Na^+ ne se trouvait que faiblement diminuée dans les mêmes conditions. Ces auteurs ont fait apparaître que c'était le processus d'échange Na^+/K^+ qui se trouvait inhibé par l'ion SCN^-, indépendamment de l'inhibition de la réabsorption du Cl^-.

Des travaux actuellement en cours (MAETZ et coll., travail non publié), réalisés suivant le protocole décrit par EPSTEIN et coll. (1973), semblent indiquer que les dérivés de la dithiole-thione exerceraient sur la pompe à chlore de la branchie d'anguille une certaine action inhibitrice comparable à celle que produit le thiocyanate, mais sans rapport direct avec leur activité diurétique chez les mammifères. Ces études révèlent également que le chlorothiazide produit dans ces conditions expérimentales une action du même type, tandis que le furosémide et l'acide éthacrynique paraissent sans action.

Sur le modèle de la cornée de grenouille il a été établi que le transport actif du chlore était inhibé par le thiocyanate de Na (ZADUNAISKY et coll. 1971), ainsi que par de faibles doses de furosémide et d'acide éthacrynique (CANDIA 1973).

La comparaison de ces résultats fait apparaître la différence de comportement d'un même produit vis à vis des divers modèles de pompe à chlore et révèle le manque de corrélation entre l'activité diurétique d'un composé et sa faculté d'inhiber le transport actif du chlore dans une situation déterminée.

En ce qui concerne les dérivés de la dithiole-thione, il faut se garder de toute interprétation abusive de ces premiers résultats. En tout état de cause, une action inhibitrice vis à vis du pompage ionique dans la branche ascendante de l'anse de HENLE ne peut être démontrée qu'à partir des observations et mesures in situ.

IV. CONCLUSIONS.

Le T.S.S. et le O.S.S. à un degré moindre exercent vis à vis de l'activité ATP-asique rénale globale un effet inhibiteur qui ne peut être tenu pour une cause prépondérante de l'activité diurétique. Il est vraisemblable que cet effet n'est qu'une des conséquences de la liaison de ces produits avec les protéines par l'intermédiaire de leurs groupements sulfhydrile.

Le fait que ces produits inhibent le transport actif du chlore dans la branchie d'anguille suggère l'hypothèse selon laquelle ils pourraient agir en empêchant la réabsorption de l'ion Cl^- dans la branche ascendante de l'anse de HENLE.

En tout état de cause, une action inhibitrice vis à vis d'un pompage ionique ne pourrait être démontrée qu'à partir d'observations et mesures in situ.

La possibilité d'union avec les protéines membranaires responsables de la perméabilité de diffusion ou de transport au niveau de la partie médullaire de la branche ascendante de l'anse de HENLE semble constituer la meilleure hypothèse pour rendre compte de l'inhibition de la réabsorption des ions sodium et chlorure et de l'action saliurétique du T.S.S. et des autres dérivés actifs de la dithiole-thione.

CONCLUSION GENERALE

Certains dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 possèdent des propriétés diurétiques.

La comparaison, dans des conditions d'utilisation identiques, des effets de dix-sept composés appartenant à cette série a permis d'établir une relation entre la constitution chimique et l'activité diurétique. L'existence et l'intensité de cette activité sont conditionnées, à l'échelle moléculaire, par :

- la réactivité de la fonction thione, en particulier sa faculté de contracter des liaisons avec les protéines,

- la présence d'un groupement fonctionnel susceptible d'assurer la résorption du produit, son assimilation par l'organisme et son excrétion au niveau du néphron ($-SO_3^-$, $-OH$, $-SO_2NH_2$).

Le groupement fonctionnel peut être fixé directement sur le cycle dithiole-thione, ou par l'intermédiaire d'un cycle benzénique ou thiophénique; il ne doit pas altérer la réactivité de la fonction thione. Les composés possédant un noyau thiophénique sont plus actifs que leurs homologues comportant un cycle benzénique et que les produits dans lesquels le groupement est placé sur le cycle dithiole-thione.

Parmi les composés étudiés, le plus actif est le thioxo-3 (dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophène-2 sulfonate de sodium ou T.S.S. qui, par sa constitution et ses propriétés, est l'élément le plus représentatif de la série. Sur le plan quantitatif, l'activité diurétique de ce produit chez le rat se situe entre celles du chlorothiazide et du furosémide.

Les études du mode d'action et du métabolisme ont été réalisées à partir de quelques composés dont le choix a été guidé par leur caractère, le but particulier de chaque type d'investigation et le souci de généraliser les résultats à l'ensemble des produits de cette série.

La cinétique et l'importance de l'action diurétique dépendent du mode d'administration. Lorsque ces produits sont injectés par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, leurs effets sont précoces, intenses et de courte durée (une à deux heures); après administration par voie digestive, ces effets sont plus tardifs, moins intenses et plus durables.

L'intensité des effets est fonction de la dose et ne peut dépasser une certaine limite.

L'action diurétique est du type saliurétique, c'est à dire que ces produits favorisent principalement l'excrétion de l'eau et du chlorure de sodium. L'excrétion du potassium est accessoirement augmentée.

L'acidité de l'urine, l'élimination des ions calcium, ammonium et phosphate sont légèrement augmentées, de même que l'excrétion de l'acide urique.

La filtration glomérulaire et le débit plasmatique rénal ne paraissent pas subir de variation significative au cours de l'action diurétique.

Les taux de glycémie et d'urée sanguine ainsi que la pression artérielle et l'électrocardiogramme ne présentent aucune modification.

Les dérivés diurétiques de la dithiole-thione exercent le même type d'activité quel que soit l'état acido-basique de l'animal. Ils favorisent la réabsorption du bicarbonate chez le sujet en état d'alcalose expérimentale.

Ces produits sont actifs chez le rat, le chien, le lapin, le cobaye et la souris. Ils n'ont pas été essayés sur d'autres espèces.

L'étude par la méthode des clearances révèle qu'en diurèse aqueuse la clearance de l'eau libre est peu modifiée tandis qu'en diurèse saline hypertonique la réabsorption de l'eau libre est abolie.

Les gradients cortico-papillaires de sodium, d'urée et d'osmolarité disparaissent pratiquement pendant l'action diurétique.

Ces résultats indiquent que l'action diurétique relève principalement d'une inhibition de la réabsorption des ions sodium et chlorure au niveau de la partie médullaire externe de la branche ascendante de l'anse de HENLE (segment de dilution médullaire). Ce point de vue est accrédité par l'étude des effets des associations du T.S.S. avec les autres types de diurétiques.

Ce mode d'action s'apparente à première vue à ceux des diurétiques mercuriels, du furosémide et de l'acide éthacrynique. Il s'en différencie cependant par le fait que les diurétiques mercuriels et l'acide éthacrynique sont pratiquement inactifs chez le rat lorsqu'ils sont employés per os, contrairement aux dérivés de la dithiole-thione. Les différences qualitatives et quantitatives entre les effets du furosémide et ceux du T.S.S. permettent de penser que l'action des composés thioniques est plus localisée que celle du furosémide et qu'elle s'exerce préférentiellement au niveau du segment de dilution médullaire.

Les dérivés de la dithiole-thione agissent donc suivant un mode particulier, différent de celui de tous les autres types de diurétiques, qui pourrait être une inhibition de la pompe à chlorure.

Les produits actifs de cette série possèdent la propriété de se lier en proportion importante aux différentes protéines. Leur excrétion est de ce fait réduite et, pendant la diurèse, ils se trouvent fixés électivement dans la région du rein où se situe leur action, c'est à dire dans la zone médullaire externe.

La fonction thione se trouve engagée dans la liaison avec les protides. Il est vraisemblable que les groupements -SH des protéines participent également à cette association. Ce type de combinaison peut être la cause de l'inhibition par les dérivés de la dithiole-thione de l'activité ATPasique rénale, compte tenu du fait que ces enzymes ne peuvent agir que si leurs groupes sulfhydriles sont libres.

A la lumière de nos expériences et des théories actuelles, l'action antienzymatique vis à vis de l'ATPase rénale ne peut être considérée que comme un facteur accessoire da l'activité diurétique.

L'hypothèse d'action la plus vraisemblable se fonde sur les arguments chimiques, biochimiques et pharmacodynamiques que nous avons révélés. Les dérivés de la dithiole-thione s'uniraient aux protéines membranaires dans la partie médullaire de la branche ascendante de l'anse de HENLE, empêchant ainsi la réabsorption active des ions (pompage de Na^+ et Cl^-) et provoquant l'action diurétique.

Lorsque ces produits sont introduits dans l'organisme ils sont résorbés dans le milieu sanguin où ils se lient en partie aux protéines plasmatiques, principalement aux albumines qui assurent leur transport dans le courant circulatoire.

Ils se fixent en proportion variable suivant leur affinité sur les protéines au niveau de différents tissus et organes, au premier rang desquels le foie et le rein.

Dans le foie, ces composés sont en partie transformés et en partie excrétés par voie biliaire. Ils sont ensuite résorbés dans l'intestin et repris par la circulation générale suivant un cycle entéro-hépatique. Seule une faible quantité s'élimine dans les fécès.

Les dérivés de la dithiole-thione sont introduits dans le néphron par filtration glomérulaire et par sécrétion tubulaire proximale faisant appel au système d'excrétion des acides, suivant les mêmes modalités que le P.A.H. avec qui ils entrent en compétition vis à vis d'un transporteur commun. Etant donné que seule la fraction libre peut être filtrée, l'excrétion urinaire est d'autant plus rapide et plus importante que la possibilité de liaison avec les protéines est plus réduite.

L'action diurétique s'exerce au cours de l'excrétion rénale; elle est conditionnée par la possibilité de fixation des produits au niveau du segment de dilution médullaire, vraisemblablement par association avec les protéines membranaires de la face apicale. Cette fixation est transitoire et sa durée est celle de l'action diurétique.

La fraction de ces produits retenue par l'organisme subit, principalement au niveau du foie qui possède un équipement enzymatique important, une dégradation catabolique qui affecte le cycle dithiole-thione. Le soufre qui provient de ce cycle se trouve incorporé dans la peau, les sécrétions, les disques intervertébraux, les cartilages de conjugaison et, en règle générale dans tous les mucopolysaccharides acides (chondroïtine-sulfates). Il s'intègre, sous différentes formes, dans le "cycle biologique du soufre" et participe à l'élaboration des divers composés soufrés de l'organisme, avant de s'éliminer in fine à l'état de sulfate.

Au niveau cellulaire, certains points concernant le mécanisme d'action et le métabolisme des dérivés de la dithiole-thione demeurent obscurs et mériteraient une étude plus approfondie. En dépit de très nombreux travaux, les mécanismes intimes d'action des puissants diurétiques actuels tels que le furosémide et l'acide éthacrynique n'ont pu être établis avec une précision supérieure.

En résumé, les dérivés de la dithiole-1,2 thione-3 exercent leur action diurétique par inhibition de la réabsorption du chlorure de sodium dans la partie médullaire de la branche ascendante de l'anse de HENLE. Leur action résulte vraisemblablement de leur union avec les protéines membranaires de la face apicale. Ils sont en partie excrétés au cours de la diurèse et en partie retenus par l'organisme qui leur fait subir un catabolisme qui a pour effet de minéraliser le soufre entrant dans la constitution de l'ensemble dithiole-thione.

Sur un plan pharmacochimique, le point le plus important paraît être la relation entre la réactivité de la fonction thione, la capacité de liaison avec les protéines et l'activité diurétique.

Si le rapport entre l'activité diurétique d'un produit et sa fixation au niveau des protéines rénales a été établi par de nombreux auteurs, celui que nous avons révélé entre la réactivité de la fonction thione et la faculté de liaison avec les protéines constitue un élément nouveau qui peut être utilisé avec profit par la recherche pharmacochimique.

Par ailleurs, l'importance de la fixation au niveau du foie de certains dérivés de la dithiole-thione et du métabolisme qu'ils y subissent justifierait une étude ultérieure plus approfondie de ces phénomènes.

Soulignons enfin la faible toxicité de ces produits dont les DL_{50} chez la souris dépassent 400 mg/kg et qui n'ont donné lieu à aucune manifestation toxique au cours de nos expériences.

B I B L I O G R A P H I E

ACETO M.D.G. et ICHNIOWSKI C. T. (1960) - Rat bioassay of combination of diuretics. J. amer pharm. Ass. sci. ed., 49, p. 647-649.

AGUS Z.S. et GOLDBERG M. (1970) - Renal mechanisms of the natriuretic and antiphosphaturic effects of triflocin, a new diuretic. J. Lab. Clin. Med., 76, p. 280-292.

AGUS Z.S., PUSCHETT J.B., SENESKY D. et GOLDBERG M. (1971) - Mode of action of parathyroid hormone and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on renal tubular phosphate reabsorption in the dog. J. clin. Invest., 50, p. 617-626.

ARDAILLOU R. (1964) - Dosage de l'acide para-amino-hippurique par l'Autoanalyseur. Communication présentée au Symposium de la Compagnie TECHNICON France, Paris.

ATHERTON J.C., GREEN R. et THOMAS S. (1971) - Effect of 0,9 % saline infusion on urinary and renal tissue composition in the hydropaenic, normal and hydrated conscious rat. J. Physiol. G.B., 210 p. 45-71.

AUSSEL P., AUDRAN M., CHANAL J.M. et MARIGNAN R. (1973) - Etude de l'interaction médicaments-protéine par diffusion brownienne. Application au système phénylbutazone-albumine. Ann. pharm. fr., 31, p. 489-494.

AWAPARA J. (1956) - Oxydation de la cystéine en sulfate et taurine. La Biochimie du soufre. Colloques Internationaux du C.N.R.S., C.N.R.S., Paris, p. 99-105.

BAER J. E., BROOKS A.V., NOLL R.M. et BEYER K.H. (1962) - Effect of hydrochlorothiazide on renal electrolyte gradient in glucose diuresis and experimental diabetes insipidus. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 137, p. 319-323.

BAER J.E., JONES C.B., MICHAELSON J.K., RUSSO H.F. et BEYER K.H. (1964) - Effect of ethacrynic acid on urine concentration. Feder. Proc., 23, p. 438.

BAER J.E., JONES C.B., SPITZER S.A. et RUSSO H.F. (1967) - The potassium sparing and natriuretic activity of N-amidino-3,5 diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride dihydrate (amiloride hydrochloride). J. Pharmacol. exper. Therapeut., 157, p. 472-485.

BAER J.E., RUSSO H.F. et BEYER K.H. (1959) - Saluretic activity of hydrochlorothiazide in the dog. Proc. Soc. exper. Biol. Med., 100, p. 442-446.

BALL G.M. et GREENE J.A. (1963) - Localization of the site of action of triamterene diuretic. Proc. Soc. exper. Biol. Med., 113, p. 326-328.

BANERJEE S.P., KHANNA V.K. et SEN A.K. (1970) - Inhibition of sodium and potassium dependant adenosine triphosphatase by ethacrynic acid : two modes of action. Molec. Pharmacol., 6, p. 680-690.

BANK N. (1968) - Physiological basis of diuretic action. Annu. Rev. Med. U.S.A., 19, p. 103-118.

BARBAGLIA G.A. (1884) - Ueber den Sulfovaleraldehyd. Ber., 17, p. 2654-2655.

BARTORELLI C., GARGANO N.et ZANCHETTI A. (1959) - Etude comparative de l'action sali-diurétique de l'hydrochlorothiazide et du chlorothiazide. J. Suisse Med., 12, p. 331-334.

BELAUD A., DARTIGUES B., DORANGE A. et PEYRAUD C. (1968) - Etude de l'activité diurétique d'un nouveau composé organique de synthèse. C. R. Soc. Biol., 162, p. 1817-1820.

BENNHOLD H. (1967) - La fonction de transport des protéines du sérum. Ann. Biol. clin., 25, p. 311-327.

BERLINER R.W., DIRKS J.H. et CIRKSENA W.J. (1966) - Action of diuretics in dogs studied by micropuncture. Ann. New York Acad. Sci., 139, p. 424-432.

BERLINER R.W., KENNEDY T.J. et ORLOFF J. (1951) - Relationship between acidification of the urine and potassium metabolism. Amer. J. Med., 11, p. 274-282.

BERLINER R.W., LEVINSKI N.G., DAVIDSON D.G. et EDEN M. (1958) - Dilution and concentration of the urine and the action of antidiuretic hormone. Amer J. Med., 24, p. 730-734.

BEYER K.H. (1950) - Functional characteristics of renal transport mechanisms. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 99, p. 227-280.

BEYER K.H. (1958) - The mechanism of action of chlorothiazide. Ann. New York Acad. Sci., 71, p. 363-379.

BEYER K.H., BAER J.E., MICHAELSON J.K. et RUSSO H.F. (1965) - Renotropic characteristics of ethacrynic acid : a phenoxyacetic saluretic-diuretic agent. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 147, p. 1-22.

BIRAGUE C., HAMID R. et DOUCHEZ J. (1971) - La sécheresse de la bouche : un problème post radiothérapique. Rev. Med. Toulouse, 7, p. 1713-1722.

BLANQUET P. et LAPARRA J. (1972) - Etude autoradiographique de la distribution de l'aspartate d'arginine dans l'organisme. La Vie Médicale, 24, p. 3013-3015.

BLICKE F.F. (1952) - Thiophene and its derivatives. Interscience Publishers, New-York, p. 29-45.

BOISSIER J.R., DUMONT C., LESBROS T. et MOISY D. (1967) - Etude pharmacologique d'un diurétique dérivé de thiochromane, le méticrane. Thérapie, 22, p. 137-147.

BOTTCHER B. (1948) - Trithiones. Chem. Ber., 81, p. 376-377.

BOTTCHER B. et BAUER F. (1951) - Uber Trithione : Notiz über einige neue Trithione. Chem. Ber., 84, p. 458-463.

BOTTCHER B. et LUTTRINGHAUS A. (1947) - Trithiones. Ann., 557, p. 89-107.

BOUDRY J.F. (1971) - Mécanismes de l'excrétion d'acide urique chez le rat. Pflügers Arch., 328, p. 265-278.

BOUDRY J.F. et ROCH-RAMEL F. (1969) - L'excrétion rénale de l'acide urique chez le rat. J. Physiol. France, 61, suppl. 2, p. 232.

BRENNER B.M., KEIMOWITZ R.I., WRIGHT F.S. et BERLINER R.W. (1969) - An inhibitory effect of furosemide on sodium reabsorption by the proximal tubule in the nephron. J. clin. Invest., 48, p. 290-300.

BRESLOW D.S. et SKOLNIK H. (1966) - Multi-sulfur and sulfur and oxygen five-and-six-membered heterocycles. Part I. Interscience Publishers, New-York, p. 347-405.

BURG M. et GREEN N. (1973 a) - Effect of mersalyl on the thick ascending limb of Henle's loop. Kidney Internation., 4, p. 245-251.

BURG M. et GREEN N. (1973 b) - Function of the thick ascending limb of Henle's loop. Amer. J. Physiol., 224, p. 659-668.

BURG M., STONE R.L., CARDINAL J. et GREEN N. (1973) - Furosemide effect on isolated perfused tubules. Amer. J. Physiol., 225, p. 119-124.

BURGER A. (1968) - Selected pharmacological testing methods (Medicinal research series, Vol. 3). M. Dekker Inc., New-York, p. 289-306.

BUZAS A. et TESTE J. (1960) - Sur la chlorosulfonylation du thiophène et de quelques uns de ses dérivés substitués. Bull. Soc. Chim., p. 793-803.

CAFRUNY E.J. et FARAH A. (1956) - Effect of mercurial diuretic mersalyl on the concentration of protein-bound sulfhydril in the cytoplasm of dog kidney cells. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 117, p. 101-105.

CAFRUNY E.J., FARAH A. et di STEFANO H.S. (1955) - Effects of the mercurial diuretic mersalyl on protein-bound sulfhydril groups in the cytoplasm of rat kidney cells. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 115, p. 390-401.

CANDIA O.A. (1973) - Short-circuit current related to active transport of chloride in frog cornea : effects of furosemide and ethacrynic acid. Biochim. biophys. Acta, 298, p. 1011-1014.

CAPPS J.N., WIGGINS W.S., AXELROD D.R. et PITTS R.F. (1952) - The effect of mercurial diuretics on the excretion of water. Circulation, 6, p. 82-89.

CHANAL J.L., MARIGNAN R., COUSSE H., BOUVIER C. et CALMETTE M.T. (1973) - Etude à l'aide des radiotraceurs de la distribution et de l'excrétion chez la souris de l'acide thiophène carboxylique et d'un de ses esters : le thiophène carboxylate de gaïacyle. Thérapie, 28, p. 1185-1196.

CIER J.F., TRAEGER J. et MAULARD C. (1959) - Un sulfamide diurétique : l'hydrochlorothiazide. Etude expérimentale et clinique. Thérapie, 14, p. 854-863.

COHEN Y. et DELASSUE H. (1959) - Modification de la méthode d'autoradiographie de S. ULLBERG sur coupes de souris entières. C. R. Soc. Biol., 153, p. 300-304.

CRAWFORD J.D., WELSH M.L. et FROST L.R. (1960) - The saluretic sulfonamides : relation between molecular structure and biological activity. Amer. J. dis. child., 100, p. 150-151.

DARTIGUES B. (1971) - Recherche du mécanisme et du lieu d'action des diurétiques par la méthode des clearances. Labo Pharma Prob. et Tech., 201, p. 16-20.

DARTIGUES B., DORANGE A., TREBAUL C., BELAUD A. et PEYRAUD C. (1969) - Facteurs chimiques de l'activité diurétique de quelques dérivés de la (thiényl-2)-5 dithiole-1,2 thione-3. C. R. Soc. Biol., 163, p. 1947-1949.

DARTIGUES B., LAPARRA J., ROQUEBERT J. et BLANQUET P. (1972) - Autoradiographie de coupes de reins de rats au moyen du sodium 22. Application à la recherche du lieu d'action des diurétiques. C. R. Soc. Biol., 166, p. 580-585.

DARTIGUES B., ROQUEBERT J., CANELLAS J. et PEYRAUD C. (1972 a) - Activité diurétique du (thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophéne-2 sulfonate de sodium (T.S.S.).
I. Etude des bilans d'excrétion chez le rat et chez le chien. Thérapie, 27, p. 491-500.

DARTIGUES B., ROQUEBERT J., CANELLAS J. et PEYRAUD C. (1972 b) - Activité diurétique du (thioxo-3 dithiole-1,2 yl-5)-5 thiophéne-2 sulfonate de sodium (T.S.S.).
II. Recherche du lieu d'action par la méthode des clearances. Thérapie, 27, p. 501-510.

DAVIES B.M.A. et YUDKIN J. (1952) - Studies on biochemical adaptation. The origin of urinary ammonia as indicated by the effect of chronic acidosis and alcalosis in the rat. Biochem. J., 52, p. 407-412.

DAVIS P.W. (1970) - Inhibition of renal Na,K-activated adenosine-triphosphatase activity by ethacrynic acid. Biochem. Pharmacol., 19, p. 1983-1989.

DEETJEN P. (1966) - Micropuncture studies on site and mode of diuretic action of furosemide. Ann. New York Acad. Sci., 139, p. 408-415.

DENIKER P., COLONNA L., LOO H., ACKERMANN R., POMPIANS-MINIAC L. et PREDINE F. (1970) - Traitement de la sécheresse buccale produite par les médicaments psychotropes. La Presse Médicale, 53, p. 2383-2384.

DEVAUX G. (1970) - Choix de Techniques de Biochimie Clinique. Gauthier-Villars Ed., Paris, 385 p.

DIRKS J.H. et SEELEY J.F. (1970) - Effect of saline infusions and furosemide on the dog distal nephron. Amer. J. Physiol., 219, p.114-121.

DIBONA G.F. (1971) - Micropuncture studies on the site of action of ethacrynic acid in the rat. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 176, p. 255-259.

DORANGE A. (1975) - Propriétés chimiques des chlorures de sulfonyle en séries dithiole-1,2 thione-3 et dithiole-1,2 one-3. Article à paraître.

DORANGE A., TONNARD F. et VENIEN F. (1973) - Etude R.M.N. d'aryl-5 dithiole-1,2 ones-3 et thiones-3. C. R. Acad. Sci., 276, p. 1057-1060.

DORANGE A. et VENIEN F. (1974) - Etude de la chlorosulfonylation des aryl-5 dithiole-1,2 ones-3 et thiones-3. Analyse R.M.N.. C. R. Acad. Sci., 279, p. 237-240.

DUBACH U.C. (1963) - Quantitative Histochemie der Niere. Untersuchungen mit Hilfe der Lowry-Methoden am Nephron. Klin. Wschr., 41, p. 157-162.

DUBACH U.C. et SCHMIDT U. (1971) - Anatomical and methodological problems of quantitative histochemistry on renal tissue. Part. I.- Recent advances in quantitative histo- and cytochemistry. Methods and applications. Hans Huber Publishers, Bern, Stuggart, Vienna, p. 345-347.

DUGGAN D.E. et NOLL R.M. (1972) - Effects of ethacrynic acid upon membrane ATPase activity of dog kidney in vivo and in vitro. Proc. Soc. exper. Biol. Med., 139, p. 762-767.

EARLEY L.E., KAHN M. et ORLOFF J. (1961) - The effects of infusion of chlorothiazide on urinary dilution and concentration in the dog. J. clin. Invest., 40, p. 857-866.

EBEL H., EHRICH J., DE SANTO N.G. et DOERKEN U. (1972) - Plasma membranes of the kidney. III.- Influence of diuretics on ATPase activity. Pflügers Arch., 335, p. 224-234.

EDWARDS B.R., BAER P.G., SUTTON R.A.L. et DIRKS J.H. (1973) - Micropuncture study of diuretic effects on sodium and calcium reabsorption in the dog nephron. J. clin. Invest., 52, p. 2418-2427.

EKNOYAN G., SUKI W.N., RECTOR F.C. Jr. et SELDIN D.W. (1967) - Functional characteristics of the diluting segment of the dog nephron and the effect of extracellular volume expansion and its reabsorptive capacity. J. clin. Invest., 46, p. 1178-1188.

ENDERS A. (1953) - Die choleretische Wirkung von Trithiolderivaten. Arzneimittel Forsch., 3, p. 557-559.

ENDERS A. et DEEKERT R. (1953) - Die Elimination von Trithionderivaten in der Gall. Arch. exper. Pathol. Pharmakol., 220, p. 418-422.

EPSTEIN R.W. (1972 a) - The binding of ethacrynic acid to rabbit kidney cortex. Biochim. biophys. Acta, 274, p. 119-127.

EPSTEIN R.W. (1972 b) - The effects of ethacrynic acid on active transport of sugars and ions and other metabolic processes in rabbit kidney cortex. Biochim. biophys. Acta, 274, p. 128-139.

EPSTEIN F.H., MAETZ J. et de RENZIS G. (1973) - Active transport of chloride by the teleost gill : inhibition by thiocyanate. Amer. J. Physiol., 224, p. 1295-1299.

FLUCKIGER E., SCHLACH W. et TAESCHLER M. (1963) - Das neue Salureticum Brinaldix. Schweiz. med. Wschr., 93, p. 1232-1237.

FORD R. et BUSH J. (1960) - Comparative clinical effects of hydrochlorothiazide and methylcyclothiazide. Current Therapeutic Research, 9, p. 430-435.

FORD R.V., MOYER J.H. et SPURR C.L. (1957) - Clinical and Laboratory Observations on Chlorothiazide (Diuril). Arch. Internation. Medicine, 100, p. 582-596.

FRANCOIS B. (1963) - Les mécanismes d'action des diurétiques. Actualités Pharmaceutiques, 22, p. 195-201.

FROMAGEOT Cl. (1946) - Quelques aspects du métabolisme du soufre chez les animaux supérieurs. Exp. annu. Biochim. med., 6e série, Masson et Cie Ed., Paris, p. 281-301.

FUMAGALLI I. (1968) - Zum Wirkungsmechanismus der heute verwendeten Diuretika. Praxis Schweiz., 57, p. 1102-1111.

GABE M. (1968) - Techniques histologiques. Masson et Cie Ed., Paris, p. 614-615.

GALLI A. et JEANMAIRE J. (1965) - Dosage colorimétrique de l'inuline dans le sang et dans les urines. Application à l'analyse automatique. Ann. Biol. clin., 23, p. 931-941.

GAUDIN O. et LOZAC'H N. (1947) - Dérivés sulfurés de l'anéthol et de l'estragol. C. R. Acad. Sci., 224, p. 577-578.

GENTRIC D. et SAUMAGNE P. (1972) - Vibration spectra of some 1,2-dithiole 3-thiones and 1,2-dithiole 3-ones between 200 and 4000 cm^{-1}. Int. J. Sulfur. Chem. (A)., 2, p. 15-23.

GIEBISCH G. (1969) - Functional organization of proximal and distal tubular electrolyte transport. Nephron, 48, p. 474-486.

GIROUD J.P. et SCHMITT H. (1968) - Données actuelles sur la pharmacologie des diurétiques. Thérapie, 2, p. 261-327.

GLASSON B. (1970) - Influence de la liaison protéinique des médicaments sur leur métabolisme. Actual. pharmacol., 23, p. 109-133.

GMELIN R. VON et LAGLER F. (1961) - Tolérance et élimination de l'anéthol-trithion. Rapport à la Société Chimique de Grunenthal-Stolberg (Rhénanie). 23-3-1961.

GOLDBERG M. (1966) - Ethacrynic acid : site and mode of action. Ann. New York Acad. Sci., 139, p. 443-452.

GOLDBERG M., Mac CURDY D.K., FOLTZ E.L. et BLUEMBLE L.W. Jr. (1964) - Effect of ethacrynic acid (a new saluretic agent) on renal diluting and concentrating mechanisms : Evidence for site of action in the loop of Henle. J. clin. Invest., 43, p. 201-216.

GOLDBERG M., RAMIREZ M.A., WANICOR D.M. et ELKINTON J.R. (1964) - Renal composition during hypotonic saline and mannitol diuresis in hydropenic dogs. Feder. Proc., 23, p. 362.

GOLDSTEIN A.M., ARONOW L.P. et KALMAN S.M. (1969) - Principles of drug action. Harper International Edition, New-York, 884p.

GOLDSTEIN M.H., LEVITT M.F., HAUSER A.D. et POLIMEROS D. (1961) - Effect of meralluride on solute and water excretion in hydrated man : Comments on site of action. J. clin. Invest., 40, p. 731-742.

GROTE I.W. (1931) - A new color reaction for soluble organic sulfur compounds. J. biol. Chem., 93, p. 25-30.

GUINNEBAULT M. (1964) - Les modalités de l'excrétion rénale de l'eau, du sodium et du potassium. Etude cinétique à l'aide d'indicateurs nucléaires. J. Physiol. France, 56, suppl. X, p. 1-118.

GUINNEBAULT M., MOREL F., CHAPEVILLE F. et FROMAGEOT P. (1956) - La distribution et l'excrétion chez le lapin de la taurine, de l'hypotaurine, du sulfate, du sulfite et de l'acide cystéine-thiosulfonique marqués au S^{35}. La Biochimie du soufre. Colloques internationaux du C.N.R.S., C.N.R.S., Paris, p. 115-118.

GYORY A.Z. et KINNE R. (1971) - Energy Source for Transepithelial Sodium Transport in Rat Renal Proximal Tubule. Pflügers Arch., 327, p. 234-260.

HALPERN B.N. et GAUDIN O. (1948) - Action de divers cholérétiques sur la composition de la bile chez le chien muni d'une fistule biliaire permanente. C. R. Soc. Biol., 142, p. 779-783.

HALPERN B.N. et GAUDIN O. (1950) - Etude expérimentale de l'action stimulante du trithioparaméthoxyphénylpropène sur la cellule hépatique. Arch. internation. Pharmacodyn., 83, p. 49-79.

HANZE S. (1960) - Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Diuretica auf die renale Magnesium und Calcium Ausscheidung. Klin. Wschr., 38, p. 1168.

HARTOUGH H.D. (1952) - Thiophene and its derivatives. 1st edition. Interscience Publishers, New-York, p. 513.

HEINEMANN H.O. et BECKER E.L. (1958) - Effect of a mercurial diuretic on the excretion of "free-water" in diabetes insipidus. J. appl. Physiol., 12, p. 51-54.

HEINEMANN H.O., DEMARTINI F.E. et LARAGH J.H. (1959) - The effect of Chlorothiazide on Renal Excretion of Electrolytes and Free-Water. Amer. J. Med., 26, p. 853-861.

HELLER J. et VOSTAL J. (1967) - The plasma sodium concentration : a factor influencing the osmolality of the fluid of the renal medullary tissue. Physiologia Bohemoslavaca, 16, p. 418-427.

HESS H.J. (1968) - Diuretic Agents. Annu. Rep. Medicin. Chem., chap. 7, p. 62-70.

HIRTZ J. (1968) - Les méthodes analytiques dans les recherches sur le métabolisme de médicaments. Masson Ed., Paris, p. 287-291.

HOOK J.B. et WILLIAMSON H.E. (1965 a) - Addition of the saliuretic action of furosemide to the saliuretic action of certain other agents. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 148, p. 88-92.

HOOK J.B. et WILLIAMSON H.E. (1965 b) - Lack of correlation between natriuretic activity and inhibition of renal Na^+ K^+ activated ATPase. Proc. Soc. exper. Biol. Med., 120, p. 358-360.

HOOK J.B. et WILLIAMSON H.E. (1965 c) - Effect of furosemide on renal medullary sodium gradient. Proc. Soc. exper. Biol. Med., 158, p. 475-486.

HWANG K., GODULA E.A. et KREUGER E.F. (1954) - A modified method of Lipschitz and Kerpscar for bioassay of diuretics in the rat. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 110, p. 27.

HWANG K. et GOLDBERG M.E. (1959) - A study of diuretics in the rat. Feder. Proc., 18, p. 405.

IMBS J.L., DESAULLES E. et SCHWARTZ J. (1970) - Action du chlorure de sodium hypertonique et du furosémide sur le flot médullaire : rôle de la rénine. J. Pharmacol. France, 1, p. 487-500.

JAMISON R.L. (1968) - Micropuncture study of segments of thin loop of Henle in the rat. Amer. J. Physiol., 215, p. 236-242.

JARD S. (1971) - Le mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique. J. Physiol. France, 63, p. 99-146.

JAVILLIER M., POLONOVSKI M., FLORKIN M., BOULANGER P., LEMOIGNE M., ROCHE J. et WURMSER R. (1964) - Traité de Biochimie Générale. T. II, 2e fasc., Masson Ed., Paris, p. 366.

KAHN J., GOLDSTEIN M.H., ALFAGO E. et LEVITT M.F. (1971) - K^+ transport and its relation to Na^+ transport in the distal tubule of the hydrated dog. Amer. J. Physiol., 221, p. 1456-1463.

KARGER W. (1967) - Biophysical aspects of ionic transfert across membranes in relation to the mode of action of diuretics. Protoplasma Osterr., 63, p. 128-131.

KESSLER R.H., LOZANO R. et PITTS R.F. (1957) - Studies on structure diuretic activity relationships of organic compounds of mercury. J. clin. Invest., 36, p. 656-668.

KINNE R. et SCHMITZ J.E. (1971) - The Na^+ K^+ -activated ATPase in Isolated Cell Membranes of The Rat Kidney Cortex. Recent Advances in Quantitative Histo- and Cytochemistry. Hans Huber Publishers, Bern, Stuggart, Vienna, p. 345-347.

KLINGSBERG E. (1960) - 1,2-Dithiolylium Salts : A new pseudoaromatic cationoid system. Chem. and Industry, p. 1568-1569.

KOKKO J.P. (1970) - Sodium chloride and water transport in the descending limb of Henle. J. clin. Invest., 49, p. 1838-1846.

KOKKO J.P. (1972) - Urea transport in the proximal tubule and the descending limb of Henle. J. clin. Invest., 51, p. 1999-2008.

KOMORN R. et CAFRUNY E.J. (1965) - Effects of ethacrynic acid on renal protein-bound sulfhydril groups. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 148, p. 367-372.

KOURILSKY R. et GAUDIN O. (1947) - Propriétés thérapeutiques du trithio-paraméthoxyphényl-propène. Bull. Acad. Nat. Med., 131, p. 267-269.

KOURILSKY R., HALPERN B.N. et MARTIN J. (1948) - Etude expérimentale et clinique de l'action cholérétique d'un nouveau dérivé soufré de synthèse. La Presse Médicale, 38, p. 457-458.

KRAKUSIN J.S. et JENNINGS R.B. (1957) - Radioautographic localization of Na^{22} in the Rat Kidney. A.M.A. Arch. Pathol., 59, p. 471-486.

KREBS H.A. (1948) - Inhibition of Carbonic Anhydrase by Sulphonamides. Biochem. J., 43, p. 525-528.

KUHN H.A. et GISCHLER E. (1955) - Klinische Untersuchungen uber die gallentreibende Wirkung von Trithion Derivaten. Arzneimittel-Forsch., 5, p. 533-556.

KUNAU R.T. Jr. (1972) - The influence of the carbonic anhydrase inhibitor, Benzolamide (CL-11366), on the reabsorption of chloride, sodium, and bicarbonate in the proximal tubule of the rat. J. clin. Invest., 51, p. 294-306.

LANDIS P.S. (1965) - The Chemistry of 1,2-dithiole 3-thiones. Chem. Rev., 2, p. 237-245.

LANDON E.J. et FITZPATRICK D.F. (1970) - Communication Symposium 4e Congrès international de Néphrologie Stockholm. Proc. 4th Intl. Congr. Nephrol, Stockholm, Vol. 2, p. 127.

LANDON E.J. et FORTE L.R. (1971) - Cellular mechanisms in renal pharmacology. Annu. Rev. Pharmacol., 11, p. 171-188.

LANDON E.J. et NORRIS J.L. (1963) - Sodium and potassium dependant adenosinetriphosphatase activity in a rat kidney endoplasmic reticulum fraction. Biochim. biophys. Acta, 71, p. 266-276.

LARAGH J.H., CANNON P.J., STASON W.B. et HEINEMAN H.O. (1966) - Physiologic and Clinical Observations on Furosemide and Ethacrynic Acid. Ann. New-york Acad. Sci., 139, p. 453-465.

LECOQ R. (1967) - Manuel d'Analyses Médicales et de Biologie Clinique. Doin Ed., Paris, 2410 p.

LE GRIMELLEC C. et de ROUFFIGNAC C. (1969) - Etude par microponction des mouvements nets d'eau, de solutés et d'urée le long du tube distal. J. Physiol. France, 61, suppl. 2, p. 337-338.

LELORD G., MERCAT C. et FUSEILLER C. (1969) - Intérêt du Sulfarlem dans la prévention des complications salivaires des traitements psychotropes. Gazette Médicale France, 76, p. 2257-2261.

LIGHT A.E. (1959) - Diuretic Activity of Various Compounds as Determinated by Urinary Excretion Studies in Rats. J. amer. pharm. Ass. sci. Ed., 48, p. 335-338.

LIGOU J.C. et NAHAS G.G. (1959) - Etude expérimentale du Chlorothiazide. J. Physiol. France, 51, p. 751-771.

LIPSCHITZ W.L., HADIDIAN Z. et KERPSCAR A. (1943) - Bioassay of diuretics. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 79, p. 97-110.

LOWRY O.H. (1953) - The quantitative histochemistry of brain. J. Histochem. Cytochem., 1, p. 420-428.

LOZAC'H N. (1967) - La Nomenclature en Chimie Organique. Masson Ed., Paris, 296 p.

LOZAC'H N. et TESTE J. (1952) - Dithiole-1,2 thiones-3 comportant un noyau thiophénique. C. R. Acad. Sci., 234, p. 1891-1893.

LOZAC'H N. et VIALLE J. (1969) - The chemistry of 1,2-dithiole ring. The chemistry of organic Sulfur Compounds, Pergamon Press Ed., chap. 10, vol. 2, p. 257-285.

LUTTRINGHAUS A. et SCHMIDT U. (1955) - Brit. Patent 730.058 May 18 (1955); C.A. 50, 6515 b (1956).

LUTTRINGHAUS A. et SCHMIDT U. (1958) - U.S. Patent 2, 846, 444, Aug-5 (1958); C.A. 53, 4303 d (1959).

LYON M.L. et PITTS R.F. (1969) - Specific differences in renal glutamine synthesis in vivo. Amer. J. Physiol., 216, p. 117-122.

MAETZ J. (1971) - Fish gills : mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. Phil. Trans. Roy. Soc. London, B, 262, p. 209-249.

MAHNERT E. (1957) - Klinische Erfahrungen mit Paramethoxyphenyl-dithiocyclopenten-thion bei Virushepatitis. Wien. Med. Woehschr., 107, p. 1055-1060.

MALNIC G., KLOSE R.M. et GIEBISCH G. (1966) - Micropuncture study of distal tubular potassium and sodium transport in rat nephron. Amer. J. Physiol., 211, p. 529-547.

MALNIC G. et de MELLO-AIRES M. (1971) - Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. Amer. J. Physiol., 220, p. 1759-1767.

MALNIC G., de MELLO-AIRES M. et VIEIRA F.L. (1970) - Chloride excretion in nephrons of rat kidney during alterations of acid-base equilibrium. Amer. J. Physiol., 218, p. 20-26.

MALVIN R.L., WILDE W.S. et SULLIVAN L.P. (1958 a) - Localization of nephron transport by stop-flow analysis. Amer. J. Physiol, 194, p. 135-142.

MALVIN R.L., WILDE W.S., VANDER A.J. et SULLIVAN L.P. (1958 b) - Localization and characterization of sodium transport along the renal tubule. Amer. J. Physiol., 195, p. 549-557.

MAREN T.H. (1958) - Carbonic anhydrase inhibition. Augmentation of the renal effect of meralluride by acetazolamide. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 123, p. 311-315.

MAREN T.H., WADWORTH B.C., YALE E.K. et ALONSO L.G. (1954) - Carbonic anhydrase inhibition. Effects of Diamox on electrolyte metabolism. John Hopkins Hosp. Bull., 95, p. 227-321.

MARTINEZ-MALDONADO M., ALLEN J.C., INAGAKI C., TSAPARAS N. et SCHWARTZ A. (1972) - Renal sodium potassium activated adenosinetriphosphatase and sodium reabsorption. J. clin. Invest., 51, p. 2544-2551.

MAUDE D.L. (1968) - Stop-flow microperfusion of proximal tubules in rat kidney cortex slices. Amer. J. Physiol., 214, p. 1315-1321.

MEYER M.C. et GUTTMAN D.E. (1968) - The binding of drugs by plasma proteins. J. pharm. Sci., 57, p. 895-918.

MILTEIN J. (1955) - Accion terapeutica de un derivado azufrado de sintesis Tritioparametoxifenilpropeno. Semana Med. Buenos-Aires, 107, p. 443-447.

MOREL F. et GUINNEBAULT M. (1961) - Les mécanismes de concentration et de dilution de l'urine. J. Physiol. France, 53, p. 75-130.

MOREL F. et ROINEL N. (1969) - Application de la microsonde électronique à l'analyse élémentaire quantitative d'échantillons liquides d'un volume inférieur à 10^{-9} l. J. Phys. Chim. Biol., 66, p. 1084-1091.

MOREL F. et de ROUFFIGNAC C. (1973) - Kidney. Annu. Rev. Physiol., 35, p. 17-54.

MORGAN T., TADOKORO M., MARTIN D. et BERLINER R.W. (1970) - Effect of furosemide on Na^+ and K^+ transport studied by microperfusion in the rat nephron. Amer. J. Physiol., 218, p. 292-297.

MUDGE G.H., AMES A., FOULKS J. et GILMAN A. (1950) - Effect of drugs on Renal Secretion of Potassium in the dog. Amer. J. Physiol., 161, p. 151-158.

MUSCHAWECK R. et HADJU P. (1964) - Action salidiurétique de l'acide chlor-N(2-furylméthyl) 5-sulfamil-anthranilique. Arzneimittel Forsch., 14, p. 44-47.

NECHAY B.R. et CONTRERAS R.R. (1972) - In vivo effect of ethacrynic acid on renal adenosinetriphosphatase in dog and rat. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 183, p. 127-136.

NIELSEN O.E. et LASSEN J.B. (1963) - Triamterene activity investigated by the stop-flow technique and in vivo studies on carbonic anhydrase. Acta Pharmacol. Toxicol., 20, p. 351-356.

NOVELLO F.C. et SPRAGUE J.M. (1957) - Benzothiadiazine dioxides as novel diuretics. J. amer. chem. Soc., 79, p. 2028-2029.

ORLOFF J. (1966) - Pittfalls in the use of stop-flow for the localization of diuretic action with special reference to Na reabsorption. Ann. New-York Acad. Sci., 139, p. 344-355.

ORLOFF J. et BURG M. (1971) - Kidney. Annu. Rev. Physiol., 33, p. 83-130.

PAUBEL J.P. et NIVIERE P. (1974) - La liaison des molécules organiques thérapeutiques avec les protéines : cas de la quinine. Chim. Ther., 9, p. 508-512.

PAZAT P. (1971) - Traitement de la sécheresse buccale post-radiothérapique par le trithioparaméthoxy-phényl-propène. La Vie Médicale, 22, p. 247.

PERSSON E. (1970) - Water Permeability in Rat Distal Tubules. Acta physiol. scand., 78, p. 364-375.

PERSSON E. et ULFENDAL H.R. (1970) - Water Permeability in Rat Proximal Tubules. Acta physiol. scand., 78, p. 353-363.

PETILLON F. (1973) - Contribution à l'étude de complexes métalliques des dithiole-1,2 thiones-3 et d'autres molécules soufrées. Thèse Doctorat d'Etat ès Sciences Physiques, Brest 1973.

PETILLON F. et GUERCHAIS J. (1971) - Coordination compounds of sulfurated molecules. Can. J. Chem., 49, p. 2598-2604.

PIAN S.Y., SCRIABINE A., Mac KERSIE D.E. et Mac LAMORE W.M. (1960) - The pharmacological activities of Benzthiazide, a non mercurial diuretic. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 128, p. 122-130.

PITTS R.F. (1958) - Some reflexions on mechanisms of action of diuretics. Amer. J. Med., 24, p. 745-763.

PITTS R.F. (1970) - Physiologie du rein et du milieu intérieur. Masson Ed., Paris, 264 p.

PITTS R.F., KRUCK F., LOZANO R., TAYLOR D.W., HEIDENREICH O.P.A. et KESSLER R.H. (1958) - Studies on the mechanism of diuretic action of chlorothiazide. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 123, p. 89-97.

POTTON F. et DESSIMOND J.L. (1963) - Effet hypocalciurique du benzothiazide. Lyon Médical, 47, p. 3-24.

PULVER R., WIRZ H. et STENGER E.G. (1959) - Uber das Verhalten des Diureticums Hygroton (G 33182) im Stoffwechsel. Schweiz. med. Wschr., 89, p. 1130-1133.

RADO J.P., SZENDE L., TAKO J., BANOS C. et BORBELY R. (1969) - Further studies on the site of action of Clopamide and Furosemide. J. clin. Pharmacol., 2, p. 99-103.

ROBELET A. et GUERRIER F. (1966) - L'élimination biliaire des médicaments. Actual. pharmacol., 19, p. 91-126.

ROBLIN R.O. et CLAPP J.W. (1950) - The preparation of heterocyclic sulfonamides. J. amer. chem. Soc., 72, p. 4890-4892.

ROCHA A.S. et KOKKO J.P. (1973) - Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. J. clin. Invest., 52, p. 612-623.

ROSIN J.M., KATZ M.A., RECTOR F.C. Jr. et SELDIN D.W. (1970) - Acetazolamide in studying sodium reabsorption in diluting segment. Amer. J. Physiol., 219, p. 1731-1738.

ROTTER W. (1961) - Klinisch-experimentelle Untersuchungen mit Felviten (Anetholtrithion). Med. Welt., 14, p. 1353-1355.

ROUFFIGNAC (de) C. et MOREL F. (1969) - Micropuncture study of Water, Electrolytes and Urea along the loop of Henle in Psammomys. J. clin. Invest., 48, p. 474-486.

RUSSO H.F., BAER J.E., NOLL R.M. et BEYER K.H. (1957) - Evaluation of chlorothiazide, a saluretic-diuretic agent in the dog. Feder. Proc., 16, p. 333.

SANTO (de) N.G. et HIERHOLZER K. (1971) - Plasma cell membranes of the rat kidney. I. Purification and properties of cell membrane ATPase. Pflügers Arch., 324, p. 1-25.

SCATCHARD G. (1949) - The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. New-York Acad. Sci., 51, p. 660-672.

SCHALES O. et SCHALES S. (1941) - A simple and accurate method for the determination of chlorides in biological fluids. J. Biol. Chem., 140, p. 879-884.

SCHMID A. (1969) - Wirkung von Thiolen auf Harnvolumen und Osmolaritat beim Kaninchen. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak., 264, p. 165-171.

SCHMIDT U. et DUBACH U.C. (1970) - The behaviour of Na^+-K^+ activated adenosinetriphosphatase in various structures of the rat nephron after furosemide applications. Nephron , 5, p. 265-278.

SCHMIDT U. et DUBACH U.C. (1971) - Na-K ATPase in the Rat Nephron Related to Sodium Transport; Results with Quantitative Histochemistry. Part. II. Recent advances in quantitative histo- and cytochemistry. Methods and applications. Hans Huber Publishers, Bern, Stuggart, Vienna, p. 320-344.

SCHUCK O. et CORT J.H. (1968) - On the interaction of calcium, sodium and water transport in the diuresing kidney. Can. J. Physiol. Pharmacol., 46, p. 275-280.

SCHULTZ E.M., CRAGOE E.J., BICKING J.B., BOLHOFER W.A. et SPRAGUE J.M. (1962) - $\alpha\beta$-unsatured ketone derivative of aryloxyacetic acids, a new class of diuretics. J. Med. Pharm. Chem., 5, p. 660-662.

SELDIN D.W., EKNOYAN G., SUKI W.N. et RECTOR F.C. (1966) - Localization of diuretic action from the pattern of water and electrolyte excretion. Ann. New-York Acad. Sci., 139, p. 328-343.

SIEDEL W., STURM K. et MUSCHAWECK R. (1967) - L'acide 4-chloro-N-furfuryl -5-sulfamoyl-anthranilique (furosémide). Prod. Probl. pharm., 12, p. 867-874.

SKOU J.C. (1963) - Studies on the sodium (Na) plus potassium (K) in activated adenosinetriphosphate (ATP) hydrolyzing enzyme system. The role of SH groups. Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, p. 79-84.

SKOU J.C. (1965) - Enzymatic Basis for Active Transport of Na^+ and K^+ Across Cell Membrane. Physiol. Rev., 45, p. 596-617.

SMALL A. et CAFRUNY E.J. (1967) - Furosemide and Hydrochlorothiazide do not have a common mode of action. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 156, p. 616-621.

SMITH H.W. (1951) - The kidney structure and function in health and disease. Oxford Univ. Press, New-York, 1049 p.

STEELE T.H. (1971) - Dual effect of potent diuretics on renal handling of phosphate in man. Metabolism, 20, p. 749-761.

STENGER E.G. et WIRZ H. (1960) - Pharmacologie et mécanisme d'action de 1'Hygroton. Médecine et Hygiène, 471, p. 1-12.

STEVENS (de) G. (1971) - Recent Advances in the Design of Diuretics. Med. Chem. U.S.A., 11, p. 421-435.

STEVENS (de) G., WERNER L.H., HALAMANDRIS A. et RICCA S. (1958) - Dihydrobenzothiadiazine Dioxides with Potent Diuretic effect. Experientia, 15, p. 463.

STOWE N. et HOOK J.B. (1970) - Role of hemodynamic changes in the effect of furosemide on the renal concentrating mechanism. Europ. J. Pharmacol., 9, p. 246-252.

STRICKLER J.C., THOMPSON D.D., KLOSE R.M. et GIEBISCH G. (1964) - Micropuncture study of inorganic phosphate excretion in the rat. J. clin. Invest., 43, p. 1596-1607.

STURM K., SIEDEL W., WEYER R. et RUSCHIG H. (1966) - Synthesen von 5-Sulfamoyl-anthranilsaüre-Derivaten. Chem. Ber., 99, p. 328-344.

SUKI W., RECTOR F.C. et SELDIN D.W. (1964) - Localization of the site of action of a new diuretic fursemide. Clin. Research, 12, p. 260.

SUKI W., RECTOR F.C. et SELDIN D.W. (1965) - The site of action of furosemide and other sulfonamide diuretics in dog. J. clin. Invest., p. 1458-1469.

TAYLOR C.B. (1963) - The effect of mercurial diuretics on adenosine triphosphatase of rabbit kidney in vitro. Biochem. Pharmacol., 12, p. 539-550.

TECHNICON (Compagnie) (1963) - Méthodologie, Compagnie Technicon, France.

TESTE J. et ANTOINE B. (1964) - Chlorosulfonylation de composés sulfurés polycycliques. C. R. Acad. Sci., 258, p. 6446-6448.

TESTE J. et DORANGE A. (1966) - Propriétés particulières des Sulfochlorures dérivés de dithiole-1,2 thiones-3 thiophéniques. Bull. Soc. Chim., p. 40.

THOMAS J., THOMAS P. et DESGREZ P. (1965) - Action hypocalciurique du benzthiazide appréciée sur 50 cas de lithiase rénale hypercalciurique. Etude conjointe de l'élimination phosphatée, magnésienne, uratique et du comportement de l'acidité titrable et du pH urinaire. Thérapie, 20, p. 1443-1461.

TREBAUL C. (1970) - Action du pentasulfure de phosphore sur des composés di- et tricarbonylés. Thèse Doctorat d'Etat ès Sciences Physiques, Brest 1970.

TRONCHET J. (1958) - La détermination complexométrique du calcium sérique. Proposition d'une technique de dosage direct. Ann. Biol. clin., 16, p. 459-470.

TURNER R.A. (1965) - Screening methods in Pharmacology. Academic Press Ed., New-York, London, p. 251-254.

ULLBERG S. (1958) - Autoradiographic studies on the distribution of labelled drugs in body. 2nd Int. conf. peaceful Uses atom. Energy. Proc. conf. Geneva, New-York, 24 U.N..

ULLRICH K.J. (1962) - Recent developments of micromethods for the study of renal physiology and pharmacology. Biochem. Pharmacol., 9, p. 181-192.

ULLRICH K.J., BAUMANN K., LOESCHKE R., RUMRICH G. et STOLTE H. (1966) - Micropuncture experiments with saluretic sulfonamides. Ann. New-York Acad. Sci., 139, p. 416-423.

ULLRICH K.J., DRENCKHAHN F.O. et JARAUSCH K.H. (1955) - Untersuchungen zum Problem der Harnkonzentrierung und -verdünnung : Uber das osmotische Verhalten von Nierenzellen und die begleitende Elektrolylanhäufung im Nierengewebe bei verschiedenen Diuresezuständen. Pflügers Arch., 261, p. 62-77.

ULLRICH K.J. et JARAUSCH K.H. (1956) - Untersuchungen zum Problem der Harnkonzentrierung und Harnverdünnung : Uber die Verteilung von Elektrolyten, Harnstoff, Aminosäuren und exogenem Kreatinin in Rinde und Mark der Hundeniere bei verschiedenen Diuresezuständen. Pflügers Arch., 262, p. 537-550.

ULLRICH K.J., RADTKE H.W. et RUMRICH G. (1971) - The role of Bicarbonate and other Buffers on Isotonic Fluid Absorption in the Proximal Convolution of the rat Kidney. Pflügers Arch., 330, p. 149-161.

VALETTE G., SAVEL J. et TARD A.M. (1958) - Valeurs comparées de l'uricémie déterminée par oxydation chimique ou enzymatique. Choix d'une méthode en fonction du diagnostic et de la thérapeutique mise en oeuvre. Ann. Biol. clin., 16, p. 217-222.

VORBURGER C. (1964) - Die akute Wirkung des Diureticums Furosemid auf das Glomerulumfiltrat, die renale Hämodynamik, die Wasser-, Natrium-, Chlorid- und Kaliumausscheidung und auf den Sauerstoffverbrauch der Nieren. Klin. Wschr., 42, p. 833-839.

WACHSTEIN M. (1955) - Histochemical staining reactions of the normally functioning and abnormal kidney. J. Histochem. Cytochem., 3, p. 246-270.

WACHSTEIN M. et MEISEL E. (1957) - Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. Amer. J. Clin. Path., 27, p. 13-23.

WALKER A., BOTT P., OLIVER J. et Mac DOWELL M.C. (1941) - The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. Amer. J. Physiol., 134, p. 580-595.

WALLIN J.D., BARRATT L.J., RECTOR F.C. et SELDIN D.W. (1973) - The influence of flow rate and chloride delivery on TC_{H2O}. Kidney Internation., 3, p. 282-290.

WALLIN J.D., BRENNAN J.P., LONG D.I., ARONOFF S.L., RECTOR F.C. Jr. et SELDIN D.W. (1973) - Effect of increased distal bicarbonate delivery on free-water reabsorption in the dog. Amer. J. Physiol., 224, p. 203-218.

WEINER I.M. et MUDGE G.H. (1964) - Renal tubular Mechanisms for Excretion of Organic Acids and Bases. Amer. J. Medicine, 36, p. 743-762.

WENSTEIN S.W. et KLOSE R.M. (1969) - Micropuncture studies on energy metabolism and sodium transport in the mammalian nephron. Amer. J. Physiol., 217, p. 498-504.

WENSTEIN E., MANITUS A. et EPSTEIN F.H. (1969) - The importance of aerobic metabolism in the renal concentrating process. J. clin. Invest., 48, p. 1855-1861.

WEPIERRE J. (1969) - Méthodes d'étude des diurétiques. Prod. Probl. pharm., 24, p. 257-268.

WESSON L.G. Jr. et ANSLOW W.P. Jr. (1952) - Effect of osmotic and mercurial diuresis on simultaneous water diuresis. Amer. J. Physiol., 170, p. 255-269.

WHITTEMBURY G. (1968) - Sodium and water transport in kidney proximal tubular cells. J. gen. Physiol., 51, p. 303-314.

WILDE W.S. et MALVIN R.L. (1958) - Graphical placement of transport segments along the nephron from urine concentration pattern developed with stop-flow technique. Amer. J. Physiol., 195, p. 153-160.

WILSON C.B. et KIRKENDALL W.M. (1970) - The effects of mefruside in the water diuretic and hydropenic dog : a comparison with chlorothiazide. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 173, p. 422-429.

WINDHAGER E.E. (1968 a) - Glomerulo-tubular balance of sale and water. Physiologist, 11, p. 103-114.

WINDHAGER E.E. (1968 b) - Micropuncture techniques and nephron function. Butterworth Ed. London.

WIRZ H., HARGITAY B. et KUHN W. (1951) - Lokalisation des Konzentrierungsprozesses in der Niere durch direkte Kryoscopie. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 9, p. 190-207.

YOSHIDA A., YAMADA T. et KOSHIKAWA S. (1971) - Effect of diuretics on energy metabolism. Biochem. Pharmacol., 20, p. 1933-1942.

ZADUNAISKY J.A., LANDE M.A. et HAFNER J. (1971) - Further studies on chloride transport in the frog cornea. Amer. J. Physiol., 221, p. 1832-1836.

ZAK G.A., BRUN C. et SMITH H.W. (1954) - The mechanism of formation of osmotically concentrated urine during the antidiuretic state. J. clin. Invest., 33, p. 1064-1074.

ZINS G.R. (1971) - Diuretics. Annu. Rep. medicin. Chem., 6, p. 88-98.

ZINS G.R. (1973) - Diuretics. Annu. Rep. medicin. Chem., 8, p. 83-92.

ZINS G.R., WALK R.A., GUSSIN R.Z. et ROSS C.R. (1968) - The diuretic activity of ethacrynic acid in rats. J. Pharmacol. exper. Therapeut., 163, p. 210-215.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - MODALITES GENERALES D'ACTION DES DIURETIQUES - GENERALITES SUR LES DITHIOLE-THIONES	3
I. MODALITES D'ACTION DES DIURETIQUES	3
1. Physiologie du néphron	4
A. Fonction du glomérule	4
B. Fonction du tubule proximal	4
C. Fonction de l'anse de HENLE	6
D. Fonction du tubule distal	10
E. Fonction du tube collecteur	11
F. Régulation de l'équilibre électrolytique	12
G. Régulation de l'équilibre hydrique	12
H. Régulation de l'équilibre acido-basique	13
I. Transport actif des ions	14
2. Clearances rénales	16
3. Action pharmacologique des diurétiques	19
A. Principes généraux de l'action diurétique	20
B. Diurétiques osmotiques	22
C. Diurétiques xanthiques	23
D. Diurétiques mercuriels	23
E. Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique	24
F. Benzothiadiazines et sulfonamides d'action voisine	25
G. Furosémide	27
H. Acide éthacrynique	28
I. Spirolactones	30
J. Triamtérène et Amiloride	30
K. Inhibiteurs de l'A.D.H.	30
L. Diurétiques divers	31
M. Tableau général	31

Pages

II. GENERALITES SUR LES DERIVES DE LA DITHIOLE - 1,2 THIONE-3. 32

1. Formule générale - Historique 32

2. Nomenclature 32

3. Synthèse 33

4. Structure physico-chimique 33

5. Propriétés physiques 34

6. Propriétés chimiques 34

A. Formation de sels de thiodithiolylium 35

B. Réactions d'addition 35

C. Réactions de substitution 35

D. Réactions d'oxydation 36

E. Réactions de réduction 36

F. Action des bases fortes 36

G. Réaction de condensation 36

7. Caractères analytiques 37

8. Usages 37

CHAPITRE II - MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES DIURETIQUES - RECHERCHE D'UNE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE 39

I. ETUDE DES PROPRIETES DIURETIQUES DU T.S.T. 40

1. Techniques 40

2. Résultats 41

3. Discussion 42

II. RECHERCHE D'UNE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE 43

1. Produits essayés 43

2. Techniques 44

3. Résultats 51

4. Discussion 51

1) Dérivés non sulfamidés 51

2) Dérivés sulfamidés 57

III. CONCLUSIONS 58

Pages

CHAPITRE III - EFFETS DU T.S.S. CHEZ L'ANIMAL 60

I. BILANS D'EXCRETION CHEZ LE RAT ET CHEZ LE CHIEN 60

1. Techniques 60

A. Expérimentation chez le rat 60

B. Expérimentation chez le chien 61

C. Méthodes chimiques 62

2. Résultats 63

A. Chez le rat 63

a) Effets en fonction de la dose et du mode d'administration 63

b) Effets en fonction du temps et du mode d'administration pour une dose de 100 mg/kg 66

c) Effets sur les excrétions du calcium, de l'ammonium, de l'acidité, du phosphate et de l'acide urique après administration par voie orale 68

d) Comparaison des effets du T.S.S. avec ceux du chlorothiazide et ceux du furosémide 70

B. Chez le chien 71

a) Effets chez le chien perfusé 71

b) Effets chez le chien non perfusé après administration du produit en une seule prise 73

3. Discussion 74

II. EFFETS DE QUELQUES ASSOCIATIONS DE DIURETIQUES AVEC LE T.S.S. CHEZ LE RAT 75

1. Principe de la méthode 75

2. Technique 75

3. Résultats 78

4. Discussion 81

A. Association T.S.S. + Acétazolamide 81

B. Association T.S.S. + Chlorothiazide 81

C. Association T.S.S. + Furosémide 81

D. Association T.S.S. + Triamtérène 82

E. Association T.S.S. + Dimercaprol 82

III. EFFETS DU T.S.S. CHEZ LE RAT DANS LES ETATS D'ACIDOSE ET D'ALCALOSE EXPERIMENTALES 83

1. Techniques 83

Pages

2. Résultats 84
3. Discussion 84
A. Expériences dans les états d'acidose expérimentale 84
B. Expériences dans les états d'alcalose expérimentale 86

IV. EFFETS DU T.S.S. CHEZ LE LAPIN, LE COBAYE ET LA SOURIS 88

1. Techniques 89
2. Résultats 89

V. EFFETS COMPARES DU T.S.S. ET DU O.S.S. CHEZ LE CHIEN 90

VI. TOXICITE 91

VII. CONCLUSIONS 91

CHAPITRE IV - RECHERCHE DU LIEU D'ACTION DU T.S.S. 94

I. CHOIX DES METHODES 94

II. ETUDE PAR LA METHODE DES CLEARANCES 96

1. Principe de la méthode 97
2. Technique 99
A. Diurèse aqueuse 99
B. Diurèse saline hypertonique 100
C. Méthodes chimiques 101
3. Résultats 101
A. Effet et durée d'action du produit 101
B. Action sur les clearances de l'inuline et du P.A.H. 105
C. Action sur l'osmolarité et la clearance osmolaire 105
D. Action sur la clearance de l'eau libre 105
E. Action sur la réabsorption de l'eau libre 106
4. Discussion 106

III. ETUDE DU GRADIENT CORTICO-PAPILLAIRE 110

1. Choix d'une méthode 110
2. Bases anatomiques 111
3. Etude par la méthode autoradiographique 112
A. Technique 112
B. Résultats 115
C. Discussion 115

Pages

4. Etude par méthode physico-chimique sur rein congelé 116
A. Technique 116
B. Résultats 117

5. Etude par méthodes physico-chimiques sur rein frais 117
A. Technique 117
B. Résultats 118
C. Discussion 118

IV. CONCLUSIONS 119

CHAPITRE V - REPARTITION, METABOLISME, ELIMINATION DU T.S.S. 122

I. CHOIX DES METHODES 122

II. ELIMINATION DU T.S.S. 123

1. Cinétique de l'élimination 123
A. Techniques 124
B. Résultats 124
a) Expérimentation chez le rat 124
b) Expérimentation chez le chien 126
C. Discussion 127
a) Expérimentation chez le rat 127
b) Expérimentation chez le chien 129

2. Etude des formes d'élimination 130
A. Etude chromatographique des urines de rat et de chien recueillies pendant la phase d'action diurétique 130
a) Techniques 130
b) Résultats 130
B. Etude radiochromatographique des urines de rats recueillies pendant la phase d'action diurétique 131
a) Techniques 131
b) Résultats 131
C. Recherche du O.S.S. dans les urines des rats ayant reçu du T.S.S. 133
a) Techniques 133
b) Résultats 134

Pages

D. Dosage du sulfate marqué dans les urines des rats ayant reçu du T.S.S. 134
a) Technique 135
b) Résultats 135
E. Recherche des formes conjuguées dans l'urine 136
F. Discussion 137

III. REPARTITION DANS L'ORGANISME DU T.S.S. MARQUE ET DE SES CATABOLITES. 138

1. Macroautoradiographies de coupes de souris 138
A. Technique 138
B. Résultats 139
C. Discussion 141
2. Répartition du T.S.S. marqué dans les organes et excreta de rat 142
A. Technique 143
B. Résultats 143
3. Localisation du T.S.S. et du O.S.S. marqués dans le rein de rat.
Etude autoradiographique 144
A. Technique 144
B. Résultats 145
C. Discussion 145

IV. ETAT ET MODALITES DE TRANSPORT DU T.S.S. DANS LE SANG PENDANT LA PHASE D'ACTION DIURETIQUE 146

1. Répartition du T.S.S. entre le plasma et les éléments figurés dans le sang de rat 146
A. Technique 146
B. Résultats 147
2. Possibilité d'existence d'une liaison entre le T.S.S. et les protéines sériques 148
A. Electrophorèse du sérum de rat et de chien. 148
B. Etude chromatographique et radiochromatographique de sérums de rats prélevés pendant la phase d'action diurétique 149
C. Caractérisation de la fraction protéique liée au T.S.S. 149
a) Technique 149
b) Résultats 150

Pages

D. Discussion 151

3. Caractères physico-chimiques de l'association du T.S.S. avec les protéines sériques in vitro 151

A. Etude spectrographique 151

a) Technique 152

b) Résultats 152

c) Discussion 155

B. Dosage du T.S.S. sérique total 157

a) Technique 157

b) Résultats 158

C. Dosage du T.S.S. sérique libre 158

a) Technique 158

- Méthode spectrophotométrique 158

- Méthode d'équilibre de dialyse 161

b) Résultats 163

c) Discussion 164

D. Facteurs modifiant la liaison du T.S.S. avec les protéines 165

E. Isothermes de liaison 166

a) Principe 166

b) Résultats 167

c) Discussion 168

V. ETAT ET MODALITES DE TRANSPORT DU T.S.S. DANS LA BILE PENDANT LA PHASE D'ACTION DIURETIQUE 168

1. Etude radiochromatographique de la bile de rat 168

A. Technique 168

B. Résultats 169

2. Cinétique de l'excrétion biliaire du T.S.S. chez le rat 169

A. Technique 169

B. Résultats 170

3. Mise en évidence d'un cycle entéro-hépatique chez le rat 170

A. Technique 170

B. Résultats 171

4. Discussion 172

VI. SECRETION RENALE DU T.S.S. 172

1. Action du probénécide sur l'excrétion du T.S.S. et l'effet diurétique 172

A. Technique 173

B. Résultats 173

C. Discussion 173

Pages

2. Influence de l'état acido-basique sur l'excrétion du T.S.S.. 174

VII. CONCLUSIONS

CHAPITRE VI - ACTION ET LOCALISATION DU T.S.S. AU NIVEAU CELLULAIRE HEPATIQUE ET RENAL 181

I. ACTION DU T.S.S. SUR L'ACTIVITE ATP-ASIQUE RENALE 182

1. Technique 182

2. Résultats 183

A. Activité ATP-asique 183

B. Activité phosphatasique acide 184

3. Discussion 184

II. LOCALISATION CELLULAIRE DU T.S.S. ET DU O.S.S. MARQUES DANS LE REIN ET LE FOIE DE RAT. ETUDE HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE 186

1. Technique 186

2. Résultats 186

3. Discussion 187

III. ACTION SUR LE TRANSPORT ACTIF DU CHLORE 187

IV. CONCLUSIONS 189

CONCLUSIONS GENERALES 190

BIBLIOGRAPHIE 196

VU

Le Président du Jury

F. Morel

Professeur F. MOREL

VU

Le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences de la Matière et
de la Mer

Professeur J. LE FLOC'H

Vu et permis d'imprimer

BREST, le 15 Décembre 1975

Le Président de l'Université
de Bretagne Occidentale

LE SECRÉTAIRE GÉNÉRAL DE
L'UNIVERSITÉ
de Bretagne Occidentale à BREST

Professeur J. QUERRE